



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA, CAMPUS II
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL – PPGCA_n

GEDEAN GALDINO DA CRUZ SILVA

**OCORRÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUTORAS DE *KLEBSIELLA*
PNEUMONIAE CARBAPENEMASE (KPC) EM PSITTACIFORMES
RESGATADOS DO TRÁFICO DE ANIMAIS NA PARAÍBA**

AREIA

2019

GEDEAN GALDINO DA CRUZ SILVA

**OCORRÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUTORAS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* CARBAPENEMASE (KPC) EM PSITTACIFORMES
RESGATADOS DO TRÁFICO DE ANIMAIS NA PARAÍBA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCAn da Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias - CCA/Campus II, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Microbiologia da Resistência.

Orientador: Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira

Coorientadora: Prof^ª. Dr.^a. Eloiza Helena Campana

Coorientador: Prof. Dr. Lauro Santos Filho

AREIA

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586o Silva, Gedeon Galdino da Cruz.

Ocorrência de *Escherichia coli* produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Psittaciformes resgatados do tráfico de animais na Paraíba / Gedeon Galdino da Cruz Silva. - Areia, 2019.

57 f. : il.

Orientação: Celso José Bruno de Oliveira.

Coorientação: Eloiza Helena Campana, Lauro Santos Filho.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Aves silvestres. 2. Enterobacteriaceae. 3. Microbiota cloacal. 4. Resistência bacteriana. I. Oliveira, Celso José Bruno de. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

GEDEAN GALDINO DA CRUZ SILVA

Ocorrência de *Escherichia coli* Produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em psittaciformes Resgatados do Tráfico de Animais na Paraíba

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração Saúde Animal do Brejo Paraibano.

APROVADA EM 27/02/2019

BANCA EXAMINADORA



Dr. CELSO JOSE BRUNO DE OLIVEIRA
UFPB

Orientador



Dra. ELOIZA HELENA CAMPANA
Examinadora



Dr. DANILO ELIAS XAVIER
Examinador

*Às aves que anunciam o nascer do sol, que
nos hipnotizam com suas cores no sólido azul
celeste, que planam levemente com seus voos
de vida e que nos alimentam com a
esperança de um dia também sermos livres,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por permitir entender a importância dos erros e acertos.

Ao Mar, por escutar minhas preces, banhar meu cansaço, aliviar meu coração e alimentar minha alma.

À minha mãe Vera Lúcia Galdino da Cruz Silva, ao meu pai Gedeão da Silva (*in memoriam*) e à minha avó Luzia Galdino da Cruz, por todas as lições de amor, abnegação, compreensão e força.

Ao meu irmão José Jullyan Galdino da Cruz Silva e ao meu primo-irmão Henry Poncio Cruz de Oliveira, por adicionar proteção e companheirismo nessa caminhada.

Aos meus cachorros Melissa Galdino da Cruz Silva e Rebeco Galdino da Cruz Silva, pelos lindos sorrisos molhados com cheiro de ração.

A (os) Tios (as) e Primos (as), que sempre estão comigo e torcem pelo meu sucesso.

A (os) meus Amigos (as), por me apoiarem e entenderem o meu isolamento temporário.

Ao Centro de Triagem de Animais Silvestres da Paraíba (CETAS-PB) (Analistas ambientais: André Guilherme Denis Lima e Paula Galvão Teixeira de Almeida; Apoio técnico: Hércules Ferreira da Silva, Ronny Relly de Souza Gomes e Neiton Douglas de Lima Silva), pelo auxílio na realização da pesquisa.

Às aves coletadas (*Ara ararauna*, *Ara macaw*, *Ara chloropterus*, *Amazona aestiva*, *Amazona festiva*, *Amazona amazonica*, *Forpus xanthopterygius*, *Diopsittaca nobilis*, *Eupsittula cactorum*, *Eupsittula aurea*, *Thectocercus acuticaudatus*, *Psittaca leucophthalmus*).

Ao meu orientador, Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira e a toda família que compõem o Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal (LAPOA) do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba, CCA/Campus II (Em especial: Priscylla Carvalho Vasconcelos e Núbia Michelle Vieira da Silva).

Aos meus coorientadores Prof^ª. Dr^ª. Eloiza Helena Campana e Prof. Dr. Lauro Santos Filho, junto à equipe do Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba, CCS/Campus I (Apoio técnico: Bernadete Helena Cavalcanti dos Santos, Maria Digian de Oliveira Arruda e Tarciso Dias da Silva) e ao Núcleo de Medicina Tropical (NUMETROP) (Apoio técnico: Edvan Aires da Silva).



FONTE: <https://deposito-de-tirinhas.tumblr.com/post/63691218270/por-mateus-gandara-batata-frita-murcha>

(Mateus Gandara)

RESUMO

A resistência bacteriana é um dos maiores desafios mundiais e as aves silvestres nesse contexto, tornando-se potentes fontes de disseminação de bactérias multirresistentes. O trabalho teve como objetivo relatar a ocorrência de *Escherichia coli* produtoras de KPC em Psittaciformes resgatados do tráfico de animais silvestres no estado da Paraíba. Para isso, swabs da microbiota cloacal de dez Papagaios Verdadeiros (*Amazona aestiva*), dois Papagaios do Mangue (*Amazona amazonica*), um Papagaio da Várzea (*Amazona festiva*), três Araras Canidés (*Ara ararauna*), três Araras Vermelhas (*Ara chloropterus*), uma Arara Macao (*Ara macaw*), cinco Maracanãs Nobres (*Diopsittaca nobilis*), um Periquito Rei (*Eupsittula aurea*), um Periquito da Caatinga (*Eupsittula cactorum*), um Periquito Tuim (*Forpus xanthopterygius*), um Periquitão Maracanã (*Psittacara leucophthalmus*) e uma Aratinga de Testa Azul (*Thectocercus acuticaudatus*), foram coletados em duplicata e acondicionados em tubos de vidro contendo 4 mL cada de caldo MacConkey e STGG - *Skim Milk, Tryptone, Glucose and Glycerin*, para posterior cultivo em meio MacConkey acrescido de antimicrobianos: (i) ceftriaxona 8 µg/mL; (ii) imipenem 1 µg/mL e (iii) polimixina B 3,5 µg/mL. Em seguida, os isolamentos foram identificados através de testes fenotípicos (TSI - *Triple Sugar Iron Agar*, LIA - *Lysine Iron Agar*, uréia, fenilalanina e MIO - *Motidad, Indol, Ornitina*), para subsequente determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos: sulfazotrim 25MCG; ertapenem 10MCG; meropenem 10MCG; imipenem 10MCG; amicacina 30MCG; ciprofloxacina 5MCG; tetraciclina 30MCG; cloranfenicol 30MCG; ceftriaxona 30MCG; ceftazidima 30MCG; ampicilina + sulbactam 20MCG; aztreonam 30MCG e amoxicilina + ác. clavulânico 30MCG, através do método de disco difusão em ágar de Muller-Hilton, segundo as recomendações do CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*). Além disso, foi realizado o teste fenotípico de disco aproximação para detecção de ESBL (*Extended-spectrum β-lactamase*). Com finalidade de identificar genes codificadores de resistência a betalactamases (CTX-M), carbapenemases (NDM e KPC) e colistina (MCR-1), os isolados também foram submetidos à técnica de PCR (*Polymerase chain reaction*) e a tipificação das amostras foi realizada pela técnica de REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic Sequence based PCR*). Dos 30 animais coletados 19 (63,3%) apresentaram crescimento bacteriano em pelo menos um dos meios de cultivo suplementados com antimicrobianos. Em relação às amostras positivas, 18 (60%) delas originaram de caldo MacConkey e 11 (36,6%) de caldo STGG. Das 60 colônias isoladas 43 (71,7%) pertenciam à espécie *Escherichia coli*. Quanto à interpretação dos antibiogramas, a ciprofloxacina apresentou a maior prevalência de linhagens resistentes. Nenhuma amostra foi positiva para a detecção de ESBL. Dos genes codificadores de resistência pesquisados apenas o *blaKPC* foi encontrado em treze isolados de sete indivíduos, sendo esses quatro de linhagens diferentes e oito cepas clones. Desta maneira, fica clara a relevância no monitoramento dessas espécies, devido à presença de isolados resistentes a antimicrobianos utilizados no tratamento clínico de bacterioses humanas e veterinárias. Além disso, o trabalho mostrou que membros da família *Enterobacteriaceae* presentes na microbiota cloacal de aves silvestres cativas podem carrear importantes genes codificadores de resistência como a KPC, sendo esse o primeiro registro do gene na ordem Psittaciformes no estado da Paraíba – Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Aves silvestres. *Enterobacteriaceae*. Microbiota cloacal. Resistência bacteriana.

ABSTRACT

Bacterial resistance is one of the greatest challenges worldwide and wild birds in this context, becoming potent sources of dissemination of multiresistant bacteria. The objective of this work was to report the occurrence of KPC - producing *Escherichia coli* in Psittaciformes rescued from the trafficking of wild animals in the state of Paraíba. For this, swabs of the cloacal microbiota of ten Turquoise-fronted Parrot (*Amazona aestiva*), two Orange-winged Parrot (*Amazona amazonica*), one Festive Parrot (*Amazona festiva*), three Blue-and-yellow Macaw (*Ara ararauna*), three Red-and-green Macaw (*Ara chloropterus*), Scarlet Macaw (*Ara macaw*), five Red-shouldered Macaw (*Diopsittaca nobilis*), one Peach-fronted Parakeet (*Eupsittula aurea*), one Cactus Parakeet (*Eupsittula cactorum*), one Blue-winged Parrotlet (*Forpus xanthopterygius*), one White-eyed Parakeet (*Psittacara leucophthalmus*) and one Blue-crowned Parakeet (*Thectocercus acuticaudatus*), were collected in duplicate and packed in glass tubes containing 4 mL each of MacConkey broth and STGG - Skim Milk, Tryptone, Glucose and Glycerin, for further culture in MacConkey medium plus antimicrobials: (i) Ceftriaxone 8 µg / mL; (ii) imipenem 1 µg / mL and (iii) polymyxin B 3.5 µg / mL. Then, the isolates were identified through phenotypic tests (TSI - Triple Sugar Iron Agar, LIA - Lysine Iron Agar, urea, phenylalanine and MIO - Motilidad, Indol, Ornithine), for subsequent determination of antimicrobial susceptibility profile: sulfazotrim 25MCG; ertapenem 10MCG; meropenem 10MCG; imipenem 10MCG; amikacin 30MCG; ciprofloxacin 5MCG; tetracycline 30MCG; chloramphenicol 30MCG; ceftriaxone 30MCG; ceftazidime 30MCG; ampicillin + sulbactam 20MCG; aztreonam 30MCG and amoxicillin + clavulanic acid 30MCG, through the disc diffusion method on Mueller-Hilton agar, through the Muller-Hilton agar diffusion method, according to CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) recommendations. In addition, we performed the phenotypic disc-approximation test for the detection of ESBL (Extended-spectrum β-lactamase). In order to identify genes coding for resistance to betalactamases (CTX-M), carbapenemases (NDM and KPC) and colistin (MCR-1), the isolates were also submitted to PCR (Polymerase chain reaction) technique and typing of the samples was performed by REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic Sequence based PCR). Of the 30 animals collected 19 (63.3%) presented bacterial growth in at least one of the culture media supplemented with antimicrobials. In relation to the positive samples, 18 (60%) of them originated from MacConkey broth and 11 (36.6%) STGG broth. Of the 60 colonies isolated 43 (71.7%) belonged to the species *Escherichia coli*. Regarding the interpretation of antibiograms, ciprofloxacin presented the highest prevalence of resistant strains. No samples were positive for ESBL detection. Of the genes encoding resistance tested only the *bla*KPC was found in thirteen isolates of seven individuals, these four being from different strains and eight strains clones. In this way, the relevance of the monitoring of these species is clear, due to the presence of antimicrobial resistant isolates used in the clinical treatment of human and veterinary bacterioses. In addition, the work showed that members of the *Enterobacteriaceae* family present in the cloacal microbiota of captive wild birds can carry important resistance - encoding genes such as KPC, being the first record of the gene in the order Psittaciformes in the state of Paraíba - Brazil.

KEYWORDS: Wild birds. *Enterobacteriaceae*. Cloacal microbial. Bacterial resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das principais famílias de sistema de efluxo bacteriano	24
Figura 2 - Classificação estrutural e bioquímica das betalactamases	29
Figura 3 - Distribuição dos discos de antimicrobianos em ágar Muller-Hilton	35

LISTA DE IMAGENS

Imagem 1 - Colheita da microbiota cloacal em Papagaio Verdadeiro (*Amazona aestiva*) .. 33

Imagem 2 - Identificação das variantes e clones 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de porinas relacionadas a quadro (s) de resistência bacteriana	23
Tabela 2 - Exemplos de bactérias Gram-negativas portadoras de bombas de efluxo RND responsáveis pelo quadro de resistência a antimicrobianos	27
Tabela 3 - Espécies e número de aves da ordem Psittaciforme coletadas (Anexo II)	32
Tabela 4 - Oligonucleotídeos iniciadores e condições de amplificação dos genes codificadores de betalactamases (CTX-M), carbapenemases (NDM e KPC) e colistina (MCR-1)	37
Tabela 5 - Resultados obtidos pela pesquisa	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Resultados da similaridade genotípica de <i>Escherichia coli</i> KPC positivas encontradas no estudo.....	40
---	----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%: Porcentagem

°C: Graus Celsius

µg: Microgramas

µL: Microlitros

µM: Micromol

ng: Nanograma

12-TMS: 12 - transmembrana-segments

14-TMS: 14 - transmembrana-segments

ABC: ATP-binding cassette superfamily

ADP: Adenosina difosfato

AIM: Australia imipenemase

AMC: Ác. clavulânico + amoxicilina

AMEs: Enzimasificadoras de aminoglicosídeos

AMI: Amicacina

AmpC: Betalactamase do tipo AmpC

APS: Ampicilina + sulbactam

ATCC: American type culture collection

ATM: Aztreonam

ATP: Adenosina trifosfato

Bla: Betalactamase (gene)

CARB: Carbenicilinase

CarO: Carbapenem resistance-associated outer membrane protein

CAU: *Caulobacter crescentus* metallo-β-lactamase

CAZ: Ceftazidima

CCS: Centro de Ciências da Saúde

CepA: Cefalosporinase da classe A

CETAS-PB: Centro de Triagem de Animais Silvestres da Paraíba

CIMs: Concentrações inibitórias mínimas

CIP: Ciprofloxacina

CLO: Cloranfenicol

CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute

CMY: Enzima que hidrolisa cefamicina

CphA: *Aeromonas hydrophila* carbapenemase

CRO: Ceftriaxona

CT: Condições de termociclagem

CTX-M: Cefotaximase isolada em Munich

DMT: Drug metabolite transporter superfamily

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid

ESBL: Extended-spectrum β -lactamase

et. al: Colaboradores

ETP: Ertapenem

GES: Guiana extended spectrum

GIM: German imipenemase

GOB: *Elizabethkingia meningoseptica* metallo- β -lactamase

H: Hidrogênio

H₂S: Sulfeto de hidrogênio

HCl: Ácido clorídrico

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IM: Inner membrane

IMI: Betalactamases que hidrolisam o imipenem

IMP: Enzima que hidrolisa o imipenem

IPM: Imipenem

KHM: Kyorin University Hospital metallo- β -lactamase

KPC: *Klebsiella Pneumoniae* carbapenemase

LAPOA: Laboratório de Produtos de Origem Animal

LB: Luria-Bertani

LIA: lysine iron agar

M: Molar

MATE: Multidrug and toxic compound extrusion

MCG: Micrograma

MCR: Mobilized colistin resistance

MER: Meropenem

MFS: Major facilitator superfamily

mg: Miligrama

MGEs: Mobile genetic elements

min: Minutos

MIO: Motidad, indol, ornitina

MIR: Miriam Hospital metallo- β -lactamase

mL: Mililitros

N°: Número

Na: Sódio

NaCl: Cloreto de sódio

NBDS: Nucleotide binding domains

NDM: New Delhi metallo- β -lactamase

NUMETROP: Núcleo de Medicina Tropical

O: Oeste

OM: Outer membrane

OmpC: Outer membrane protein C

OmpF: Outer membrane protein F

OmpK35: *Klebsiella pneumoniae* (35) outer membrane protein

OmpK36: *Klebsiella pneumoniae* (36) outer membrane protein

Omps: Outer membrane proteins

OmpU: Outer membrane protein U

OprD: Outer membrane protein D

OXA: Oxacilinase

P99: *Enterobacter cloacae* (P99) metalo- β -lactamase

PB: Estado da Paraíba

PB*: Pares de base

PBPs: Penicillin-binding proteins

PC1: *Staphylococcus aureus* PC1

PCR: Polymerase chain reaction

PER: *Pseudomonas* extended resistant

pH: Potencial hidrogeniônico

Pi: Fosfato inorgânico

PIB: Porin IB

PMQR: Plasmid-mediated quinolone resistance

PSE: *Pseudomonas* specific enzyme

QRDR: Quinolone-resistance determining region

REP-PCR: Repetitive extragenic palindromic sequence based PCR

RNA_m: RNA mensageiro

RND: Resistance nodulation-division superfamily

rpm: Rotações por minuto

RTG: Betalactamase da classe A

S: Sul

seg: Segundos

Sfh: *Serratia fonticola* carbapenem hydrolase

SHV: Sulfhydryl-Variable β -Lactamase

SIM: Seoul imipenemase

SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SME: *Serratia marcescens* enzyme

SMR: Small multidrug resistance family

SPM: São Paulo metalo- β -lactamase

spp: Espécie

STE: Solução de *Tris* HCl, EDTA e NaCl

STGG: Skim milk, tryptone, glucose and glycerin

SUT: Sulfazotrim

TBM: Tribenuron-metilo metallo- β -lactamase

TDMs: Transmembrane domains

TE: Solução de *Tris* HCl mais EDTA

TEM: Temoniera β -lactamase

TET: Tetraciclina

TSA: Tryptic soy agar

TSI - Triple sugar iron agar

U: Unidades

USA: United States of America

VEB: Vietnamese extended-spectrum β -lactamase

VIM: Verona integron-borne metallo- β -lactamase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	OBJETIVO GERAL.....	19
2.1	2.1 Objetivos específicos.....	19
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
3.1	A ordem Psittaciforme.....	20
3.2	O tráfico de Psittaciformes no Brasil e no estado da Paraíba.....	20
3.3	A importância do estudo da microbiota cloacal em cativeiro	21
3.4	Mecanismos de resistência.....	22
3.4.1	Canais de porinas.....	22
3.4.2	Sistema de efluxo celular.....	24
3.4.2.1	<i>Major facilitator superfamily</i> (MFS)	25
3.4.2.2	<i>ATP-binding cassette superfamily</i> (ABC)	25
3.4.2.3	<i>Small multidrug resistance family</i> (SMR)	26
3.4.2.4	<i>Resistance nodulation-division superfamily</i> (RND)	26
3.4.2.5	<i>Multidrug and toxic compound extrusion</i> (MATE)	28
3.4.3	Produção de enzimas bacterianas.....	29
3.4.3.1	Betalactamases	29
3.4.3.1.1	Classes A e D – Grupo II	30
3.4.3.1.2	Classe B – Grupo III	30
3.4.3.1.3	Classe C – Grupo I	30
3.4.3.1.4	Grupo IV	31
3.4.4	Proteção e bloqueio do sítio alvo do antibacteriano.....	31
4	METODOLOGIA.....	32
4.1	Local de estudo e colheita das amostras	32
4.2	Cultivo e isolamento	33
4.3	Identificação fenotípica	34
4.4	Perfil de sensibilidade antimicrobiana	34
4.5	Reação em cadeia de polimerase (PCR)	35
4.5.1	Extração e quantificação do material genético.....	36
4.5.2	Genes codificadores de resistência a betalactamases, carbapenemases e colistina	36
4.6	Diversidade genotípica das cepas de <i>Echerichia coli</i>	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44
	ANEXO I	51

ANEXO II.....	53
ANEXO III	56
ANEXO IV	57

1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana é considerada uma das maiores ameaças globais da atualidade. Apesar de ser um fenômeno natural, a rápida disseminação de bactérias resistentes está diretamente relacionado ao uso inadequado dos antimicrobianos, o que tem gerado graves consequências clínicas e econômicas, associadas ao aumento da morbidade e mortalidade de pacientes devido à ineficácia dos tratamentos terapêuticos (LOUREIRO *et al.*, 2016).

Nesse cenário as aves silvestres ocupam um papel relevante, visto que essas habitam vários nichos ecológicos e atuam como biomarcadores, sendo capazes de adquirir microrganismos de origem humana ou ambiental, tornando-se potentes disseminadoras de resistência. Há evidências que nessa situação, a contaminação geralmente acontece através do contato com resíduos ou entre indivíduos no processo de migração de algumas espécies (SILVA *et al.*, 2018).

As consequências disso para a vida selvagem ainda são pouco estudadas, porém em cativeiro medidas medicamentosas podem ser comprometidas. Além disso, programas de reintrodução de espécies com baixa diversidade biológica em ambientes naturais podem ser desfavorecidos. Visto que esses animais podem transportar microrganismos multirresistentes para outros táxons de vida livre, espécies domésticas de produção e seres humanos. Nesse sentido, a identificação de indivíduos que albergam bactérias multirresistentes pode ser bastante relevante dentro de uma população ou localização espacial tornando-se alvos de vigilância e controle (ARNOLD; WILLIAMS; BENNETT, 2016).

Outra situação preocupante é o crescente interesse das pessoas por aves como animais de estimação. Dentre as ordens, os Psittaciformes são os mais procurados devido a fácil adaptação, as cores da plumagem e a capacidade de imitar sons humanos (TRINDADE; FIGUEIRA, 2018; 1º RELATÓRIO NACIONAL SOBRE O TRÁFICO DE FAUNA SILVESTRE, 2009). Apesar da existência de alguns estudos sobre o perfil de sensibilidade de enterobactérias e a presença de genes de resistência nessas aves, há carência de informações sobre o tema no estado da Paraíba (Brasil), sendo tal investigação importante, visto que 40% das doenças humanas originam-se do meio silvestre (ARNOLD; WILLIAMS; BENNETT, 2016).

2 OBJETIVO GERAL

Relatar a ocorrência de *Escherichia coli* produtoras da KPC em Psittaciformes resgatados do tráfico de animais silvestres no estado da Paraíba.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar bacilos Gram-negativos fermentadores da microbiota cloacal de indivíduos da ordem Psittaciforme.
- Identificar o gênero *Escherichia* através de testes bioquímicos de fenotipagem.
- Caracterizar o perfil de sensibilidade bacteriana utilizando o método de disco-difusão.
- Detectar genes codificadores de resistência às betalactamases (CTX-M), carbapenemases (NDM e KPC) e colistina (MCR-1);
- Tipificar a similaridade genotípica dos isolados portadores dos genes de resistência.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A ordem Psittaciforme

Os Psittaciformes são bem distribuídos mundialmente e habitam os mais variados ecossistemas terrestres, com exceção das superfícies geladas da Antártida (HIGGINS, 1999). Sugere-se que esses animais se originaram na *Gondwana* ao decorrer do período Cretáceo e se diversificaram no pós Cretáceo (WRIGHT *et al.*, 2008). Segundo Favretto (2002), por muito tempo, poucos estudos foram publicados sobre a diversidade da classe durante esse período. Porém, a partir da década de 1990, achados fósseis permitiram esclarecimentos sobre a presença das aves na era Mesozóica.

Atualmente, a ordem é composta por três superfamílias que englobam seis importantes famílias: Strigopoidea (Strigopidae e Nestoridae), Cacatuoidea (Cacatuidae) e Psittacoidea (Psittacidae, Psittichasidae e Psittaculidae) (JOSEPH *et al.*, 2012). As quais incluem 96 gêneros e 356 espécies (HIGGINS, 1999), sendo a família Psittacidae o táxon mais populoso, representado por 332 espécies (BEISSINGER; SNYDER, 1992).

3.2 O tráfico de Psittaciformes no Brasil e no estado da Paraíba

O comércio ilegal de psitacídeos no Brasil representa uma ameaça à biodiversidade (COSTA *et al.*, 2018). O grupo possui o maior número de espécies sob risco de extinção do país (1º RELATÓRIO NACIONAL SOBRE O TRÁFICO DE ANIMAIS SILVESTRES, 2009), sendo a espécie Ararinha Azul (*Cyanopsitta spixii* – Wagler, 1832) já extinta da natureza e outras como a Arara Azul de Lear (*Anodorhynchus leari* - Bonaparte, 1856), Jandaiá Amarela (*Aratinga solstitialis* – Linnaeus, 1766), Tiriba de Peito Cinza (*Pyrrhura griseipectus* – Salvadori, 1900) e Tiriba de pfrimer (*Pyrrhura pfrimeri* – Miranda-Ribeiro, 1920) classificadas como em perigo (LIVRO VERMELHO DA FAUNA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO, 2016).

Poucos estudos relatam a atual situação do tráfico desses animais no estado da Paraíba. Entretanto, o Periquito da Caatinga (*Eupsittula cactorum*, Kuhl 1820) segundo Pagano *et al.* (2009) foi o psitacídeo mais resgatado entre os anos de 2006-2007. Em outra situação, na cidade de Campina Grande (PB), os mesmos foram descritos junto com as

espécies Papagaio Verdadeiro (*Amazona aestiva*, Linnaeus 1758) e Maracanã Nobre, (*Diopsittaca nobilis*, Linnaeus 1758), como a segunda maior família encontrada em residências do município (LICARIÃO; BEZERRA; ALVES, 2013). É nesse contexto que milhares de indivíduos são retirados da natureza e mantidos em cativeiro tornando-se importantes fontes de investigação epidemiológica (SOUZA; VILELA; CÂMARA, 2014).

3.3 A importância do estudo da microbiota cloacal em cativeiro

As aves silvestres são susceptíveis a doenças oportunistas e atuam como reservatórios biológicos de diversos patógenos (SANCHES *et al.*, 2017). Dentre tais, as bactérias cloacais vêm sendo estudadas em larga escala, e tem demonstrado implicações significativas na saúde e fisiologia dos hospedeiros (VIDEVALL *et al.*, 2018), no rastreamento de zoonoses emergentes e na identificação de genes codificadores de resistência (TORO *et al.*, 2016).

A microbiota intestinal desses animais é constituída principalmente por bactérias Gram-positivas e em menor quantidade por Gram-negativas (SAIDENBERG *et al.*, 2015), sendo o aumento da população de alguns integrantes da família *Enterobacteriaceae* um indicativo de enfermidades ou desequilíbrio fisiológico (MACHADO *et al.*, 2016). Dentre os microrganismos estão presentes na maioria dos casos o gênero *Salmonella* e a espécie *Escherichia coli*, e em menores números *Shigella* spp., *Edwardsiella tarda*, *Proteus* spp., *Hafnia alvei*, *Serratia* spp., *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Providencia alcalifaciens* e *Klebsiella pneumoniae* (LOPES *et al.*, 2015; HIDASI *et al.*, 2013).

A sintomatologia associada à doença primária ou secundária geralmente é inespecífica, como letargia, penas eriçadas, anorexia, diarreia, poliúria, conjuntivite, rinite, dispneia, inchaço articular, sinais nervosos, edema subcutâneo, perda de peso e morte súbita (GODOY, 2014). Para o tratamento, o uso de antibióticos é a intervenção terapêutica preconizada, porém, quadros de resistência tem progressivamente evidenciado o papel dos psitacídeos como hospedeiros e possíveis reservatórios de genes de resistência (MACHADO *et al.*, 2016; VASCONCELOS *et al.*, 2014).

3.4 Mecanismos de resistência

Vários autores referem à alteração em porinas, o efluxo celular ativo, a produção de enzimas bacterianas e as mutações gênicas ocasionadas pelas variações naturais ou alterações adquiridas no local de destino da ligação da droga, como os principais mecanismos associadas à resistência bacteriana.

3.4.1 Canais de porinas

A bicamada externa de bactérias Gram-negativas atua como um sistema de proteção à membrana citoplasmática. A monocamada externa é composta de lipossacarídeos com uma composição de carboidratos variáveis junto a longas cadeias de oligossacarídeos que protegem a célula contra o reconhecimento do sistema complemento e substâncias hidrofóbicas. Já a monocamada voltada para o espaço periplasmático é composta basicamente por fosfolípídeos (WELTE, NESTEL, DIEDERICHS, 1995). Entre essas, encontramos canais filtradores conhecidos como porinas ou *Omps* (*Outer membrane proteins*) (LIN *et al.*, 2015).

Segundo Delcour (2010), essas estruturas são formadas por trimeros de barris β , os quais permitem a rápida difusão de biomoléculas hidrofílicas. O poro também é descrito pelo autor como curvado para seu interior, formando a chamada zona de constrição a qual determina o limite de exclusão de tamanho e outras propriedades de permeabilidade. Durante anos essas características foram alvos de investigação e contribuíram para o esclarecimento dos mecanismos modulatórios da função dessas proteínas.

A primeira modulação funcional descrita foi o potencial transmembranar (SCHINDLER; ROSENBUSCH, 1978), a inativação dependente da voltagem é um fenômeno frequentemente relatado em diferentes espécies de porinas, junto às mutações residuais de poros específicos. Outras duas formas de fechamento desses canais estão associadas à presença do pH ácido e a ligação de poliaminas. Nesse contexto, à diminuição do percentual de entrada dessa via em bactérias Gram-negativas, pode ocasionar quadros de resistência a diversos antimicrobianos (Tabela 1) (DELCOUR, 2010).

Tabela 1: Exemplos de porinas relacionadas a quadro (s) de resistência bacteriana.

BACTÉRIAS	PORINAS	ANTIMICROBIANOS
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>OprD</i>	Carbapenêmicos
<i>Escherichia coli</i>	<i>OmpC, OmpF</i>	Betalactâmicos
<i>Serratia marcescens</i>	<i>OmpC, OmpF</i>	Betalactâmicos
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>OmpK35</i> <i>OmpK36</i>	Carbapenêmicos, Cefalosporinas, Fluorquinolonas e Cloranfenicol. Carbapenêmicos
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>OmpF</i>	Carbapenêmicos
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>OmpC, OmpF</i> <i>OmpK36</i>	Carbapenêmicos Cefpirome, Cefepime e Imipenem
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>OmpK36</i>	Carbapenêmicos
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>PIB</i>	Betalactâmicos, Tetraciclinas e Fluorquinolonas
<i>Salmonella enterica</i>	<i>OmpC</i> <i>OmpF</i>	Cefalosporinas Cloranfenicol e Imipenem
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>OmpU</i>	Cefalosporinas
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>CarO</i>	Carbapenêmicos

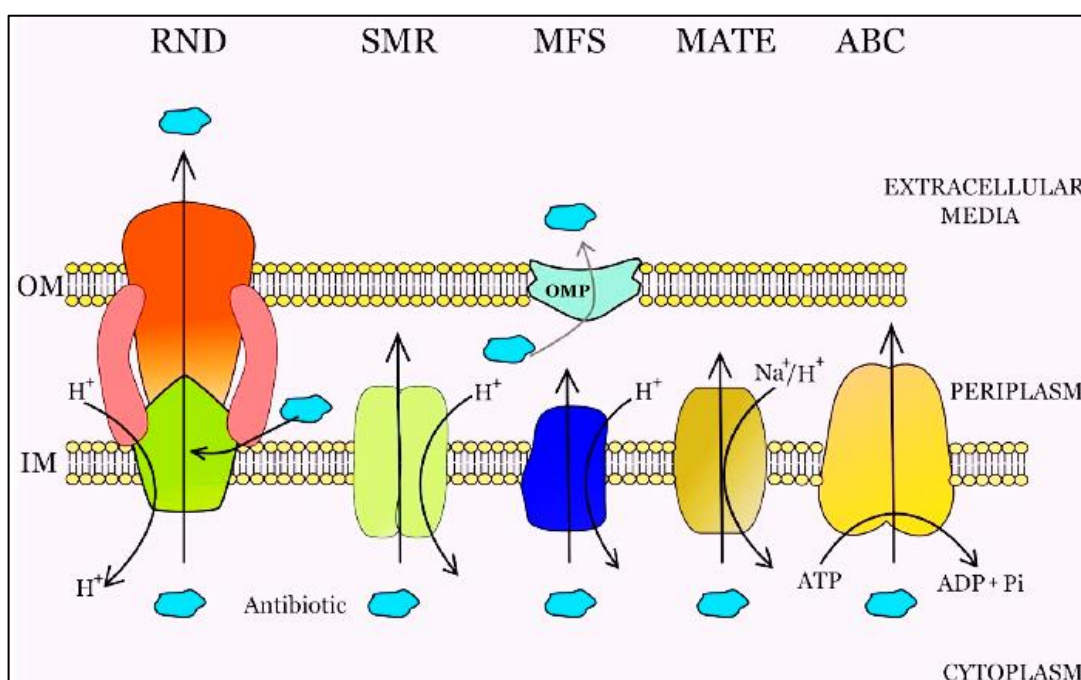
FONTE: Adaptado de Fernández e Hancock, 2012.

Dentre as espécies bacterianas, a *Pseudomonas aeruginosa* vem sendo vastamente estudada devido à capacidade de multirresistência aos carbapenêmicos. Neves *et al.* (2011) relaciona tal acontecimento a mecanismos como a ausência ou redução da expressão de porinas do tipo *OprD*, ocasionando especificamente o quadro de resistência ao imipenem e diminuição da susceptibilidade ao meropenem. Mutações no gene *oprD* também podem conduzir à inativação da *OprD*, aumentando as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para os carbapenêmicos.

3.4.2 Sistema de efluxo celular

O efluxo celular é responsável pela excreção de substâncias tóxicas resultantes do metabolismo bacteriano. A resistência geralmente está associada à hiperexpressão dos genes reguladores do sistema de expulsão dos antimicrobianos por transportadores de múltiplas drogas (MAGNET; COURVALIN; LAMBERT, 2001). De acordo com a estrutura, a fonte de energia utilizada e o tipo de moléculas exportadas, esses podem ser dividido em cinco famílias: *major facilitator superfamily* (MFS), *ATP-binding cassette superfamily* (ABC), *small multidrug resistance family* (SMR), *resistance nodulation-division superfamily* (RND), *multidrug and toxic compound extrusion* (MATE) e *drug metabolite transporter superfamily* (DMT) (Figura 1) (SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015).

Figura 1: Representação esquemática das principais famílias de sistema de efluxo bacteriano.



LEGENDA: RND: *resistance nodulation-division superfamily*; SMR: *small multidrug resistance family*; MFS: *major facilitator superfamily*; MATE: *multidrug and toxic compound extrusion*; ABC: *ATP-binding cassette superfamily*; OM: membrana externa (*outer membrane*); IM: membrana interna (*inner membrane*); OMP: *outer membrane proteins*; H: hidrogênio; Na: sódio; ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; Pi: fosfato inorgânico. FONTE: Blanco *et al.* (2016).

3.4.2.1 *Major facilitator superfamily* (MFS)

A superfamília facilitadora é o segundo maior grupo de transportadores da membrana de eucariotos, bactérias e arqueobactérias (PAO; PAULSEN; SAIER JR, 1998). O grupo é representado por 74 famílias, possuem 400-600 aminoácidos residuais de comprimento, 12-14 ou ocasionalmente 24 chaves α -helicoidais (LEE; SANDS; BIGGIN, 2016) e é responsável pela condução de solutos e íons como, açúcares, drogas, polióis, neurotransmissores, metabolitos do ciclo de *Krebs*, intermediários glicolíticos fosforilados, aminoácidos, peptídeos, osmólitos, sideróforos (efluxo), sideróforos de ferro (captação), nucleosídeos, ânions orgânicos e ânions inorgânicos (TCDB, 2019).

Outra importante atribuição intrínseca ou adquirida da MFS é a capacidade de conferir resistência bacteriana utilizando o antiport droga/próton (H^+) para catalisar a atividade de efluxo dos antimicrobianos, sendo o 12-TMS (NorA, TetA, EmrD e MdfA) e 14-TMS (QacA, QacB e EmrAB) os principais responsáveis pela inibição (KUMAR *et al.*, 2016). Hickman e Levy (1988), foram os primeiros a descrever esse tipo de restência associada à proteína TetA em *Escherichia coli*, a qual é controlada pelo repressor sensível a tetraciclina (TetR), que regula a expressão de RNAm e conduz a tetraciclina do citosol para o espaço periplasmático, limitando assim o acesso do antimicrobiano aos ribossomos da célula.

3.4.2.2 *ATP-binding cassette superfamily* (ABC)

A superfamília cassete de ligação ao ATP são proteínas encontradas em todos os seres vivos e transportam uma grande variedade de compostos através das membranas celulares. Em procariontes são conhecidas por transportar nutrientes essenciais e exportar moléculas tóxicas. Esses transportadores possuem uma estrutura central que consiste em dois domínios transmembranares (TDMs) que determinam a especificidade do substrato e dois domínios de ligação de nucleotídeos (NBDS) que fornecem energia para hidrolisar a ATP (CHEN *et al.*, 2017). Os NBDS por sua vez, ainda são subclassificados em: motivo Walker A, quando possui um resíduo de lisina interagindo com um nucleotídeo de ATP e Walker B quando apresentam dois resíduos de aminoácidos precedidos por quatro resíduos hidrofóbicos (SANTANA; CRUZ; MARBACH, 2016).

Sob condições fisiológicas naturais, os transportadores ABC são vias ativas que operam em uma única direção (seja importação ou exportação), tal acontecimento implica que em ambas as situações o domínio da membrana comporta-se de forma semelhante, alterando sua conformação para favorecer a passagem. Dessa família, as proteínas ligadas ao sistema de captação da maltose realizada pela bactéria *Escherichia coli* são descritas como a melhor caracterizada estruturalmente e mecanicamente (CHEN *et al.*, 2017). Porém, em outro contexto, Fitzpatrick *et al.* (2017) também atribuem a bomba de efluxo ABC do tipo Mac-A-Mac-B-TolC encontrada na mesma espécie a exportação de antimicrobianos pertencentes a classe dos macrolídeos.

3.4.2.3 *Small multidrug resistance family* (SMR)

O sistema de efluxo pertencente à pequena família multidroga resistente (SMR) é composto por pequenas proteínas helicoidais de quatro transmembranas que viabilizam o papel de resistência a antimicrobianos e antissépticos (KERMANI *et al.*, 2017). Algumas espécies de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* já foram descritas por Ovchinnikov *et al.*, (2018) como portadoras do mecanismo, porém, o membro mais estudado do grupo é o sistema de efluxo EmrE, encontrado em *Escherichia coli*, (KERMANI *et al.*, 2017), o qual Saleh, Bay e Turner (2018), relatam sua importância devido a frequente detecção em plasmídeos de resistência a vários antimicrobianos hidrofóbicos catiônicos.

3.4.2.4 *Resistance nodulation-division superfamily* (RND)

Os sistemas de efluxo da superfamília de divisão de células de resistência-nodulação (RND) desempenham um papel importante na resistência a múltiplos antimicrobianos em Gram-negativas (Tabela 2). Essas vias consistem em três componentes: a proteína de membrana interna (IMP), a proteína de fusão periplasmática (MFP) e a proteína da membrana externa (OMP) (TOBA *et al.*, 2019). Além disso, catalisam o substrato por meio do antiporto H^+ e são agrupados em dez famílias filogenéticas de acordo com sua especificidade, sendo o complexo AcrAB-TolC em *Escherichia coli* um dos mais conhecidos (BOHNERT; SCHUSTER; KERN, 2013).

Tabela 2. Exemplos de bactérias Gram-negativas portadoras de bombas de efluxo RND responsáveis pelo quadro de resistência a antimicrobianos.

BACTÉRIA	BOMBA DE EFLUXO RND	SUBSTRATO
<i>Acinetobacter baumannii</i>	AdeABC	Cloranfenicol, eritromicina, fluoroquinolonas, tetraciclina e trimetropim.
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	BCAL 1674-1575-1676	Quinolonas
	BCAL 2822-2821-2820	Aminoglicosídeos, betalactâmicos, cloranfenicol, fluoroquinolonas e quinolonas.
	BCAM 1945-1946-1947	Aminoglicosídeos, betalactâmicos, brometo de etídio e fluoroquinolonas.
<i>Campylobacter jejuni</i>	CmeABC	Aminoglicosídeos, betalactâmicos, cloranfenicol, brometo de etídio, fluorquinolonas, macrolídeos, quinolonas, rifampicina e tetraciclina.
<i>Erwinia amylovora</i>	AcrAB	Betalactâmicos, brometo de etídio, quinolonas e tetraciclina.
<i>Escherichia coli</i>	AcrAB	Betalactâmicos, cloranfenicol, brometo de etídio, fluoroquinóis, macrolídeos e novobiocina, rifampicina.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AcrAB	Fluoroquinolonas e brometo de etídio.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	MtrCDE	Betalactâmicos, macrolídeos e rifampicina.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MexAB-OprM	Betalactâmicos, cloranfenicol, brometo de etídio, fluoroquinolonas, macrólidos, quinolonas e tetraciclina.
	MexCD-OprJ	Betalactâmicos, cloranfenicol, fluoroquinolonas, novobiocina, tetraciclina e trimetropim.
	MexEF-OprN	Cloranfenicol, fluoroquinolonas e trimetropim.

	MexXY	Aminoglicosídeos, macrólidos e tetraciclina.
	MuxBC-OmpB	Betalactâmicos, macrolídeos, novobiocina e tetraciclina.
<i>Pseudomonas syringae</i>	MexAB-OprM	Aminoglicosídeos, betalactâmicos, brometo de etídio, fluoroquinolonas, macrolídeos, nitrofurontoina, quinolonas, rifampicina e tetraciclina.
<i>Salmonella typhimurium</i>	AcrAB	Betalactâmicos, cloranfenicol, fluoroquinolonas, macrolídeos, novobiocina e quinolonas.
<i>Vibrio cholerae</i>	VexAB	Betalactâmicos, macrolídeos, novobiocina e polimixina B.
	VexCD	Novobiocina
	VexIJK	Betalactâmicos e novobiocina
	VexGH	Betalactâmicos e novobiocina

FONTE: Adaptado de Fernando e Kumar (2013); Yuhan *et al.* (2016).

3.4.2.5 Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)

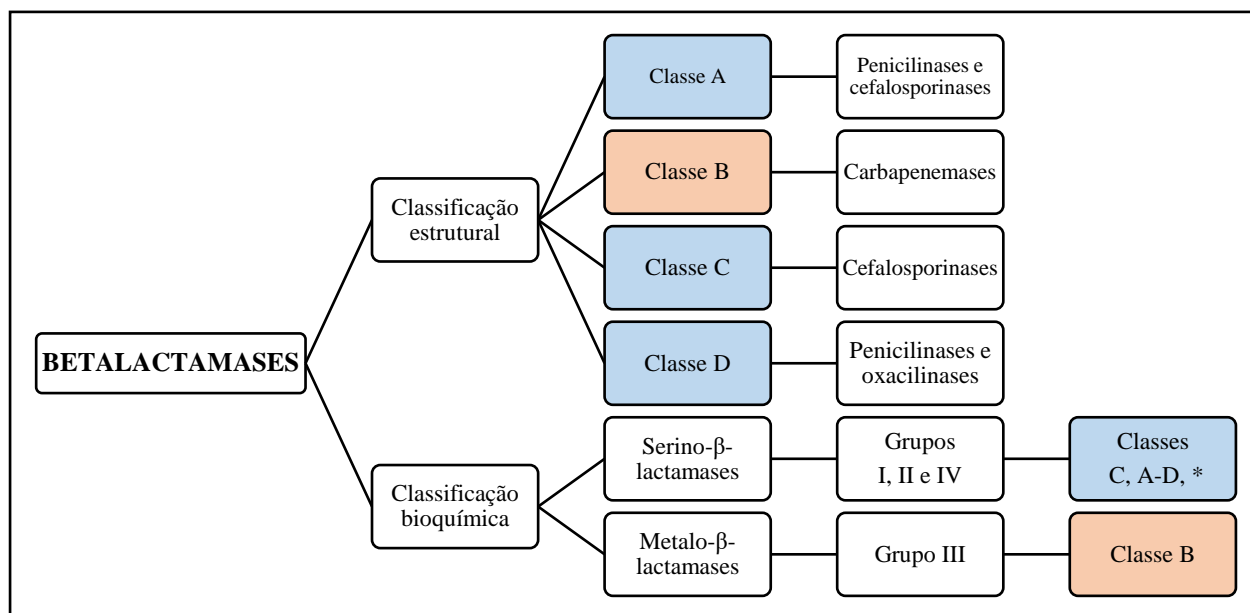
Os transportadores do tipo extrusão de compostos tóxicos e multidrogas foram reconhecidos em 1999 e são amplamente distribuídos entre procariotas e eucariotas (EISINGER *et al.*, 2018). Nos humanos hMATE1 e hMATE2 atua na excreção renal de resíduos metabólicos e cátions xenobióticos orgânicos (YANG *et al.*, 2018). Em plantas são responsáveis pela desintoxicação de metabólitos secundários (LI; HE; HE, 2019). E nas bactérias estão associados a quadros de multirresistência (LU, 2016). A família utiliza os íons H^+ e Na^+ como gradientes eletroquímicos (EISINGER *et al.*, 2018), é formada por aproximadamente 900 proteínas, as quais são constituídas de uma única cadeia de 450 a 550 aminoácidos e 12 hélices transmembranares e são subclassificadas de acordo com a similaridade da sequência de seus aminoácidos em NorM, DinF e eucarióticas (LU, 2016).

3.4.3 Produção de enzimas bacterianas

3.4.3.1 Betalactamases

As betalactamases são responsáveis por quadros de resistência a antimicrobianos da classe dos betalactâmicos. O primeiro registro desse mecanismo foi em 1940 por Abraham e Chain. Porém, só em 1973 Richmond e Sykes apresentaram um esquema de classificação para as enzimas em Gram-negativos, sendo melhorado por Matthew em 1976. Atualmente a classificação atualizada baseia-se na proposta de 1995 sugerida por Bush, Jacoby e Medeiros, onde são categorizadas de acordo com sua funcionalidade em quatro classes (A, B, C e D) (BUSH; JACOBY, 2010). Já do ponto de vista bioquímico Ambler (1980) divide essas enzimas em duas categorias: serino betalactamases (apresentam um aminoácido serina no sítio catalítico das enzimas) e metalo betalactamases (necessitam de um metal como cofator para a atividade catalítica), além de dispô-las em quatro grupos (I, II, III e IV) (Figura 2).

Figura 2. Classificação estrutural e bioquímica das betalactamases.



LEGENDA: AZUL e ROSA: classes correspondentes. (*): não classificado. FONTE: Adaptado de Ambler 1980; Bush e Jacoby, 2010.

3.4.3.1.1 Classes A e D – Grupo II

As betalactamases das classes A e D, pertencentes ao grupo II, são as enzimas mais numerosas, principalmente devido a crescente identificação de betalactamases de espectro estendido (ESBL). Segundo Macedo *et al.*, (2005), os membros da classe A (PC1, TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, PSE, CARB, RTG, CepA, KPC, IMI, GES e SME) são importantes serino-proteases, as quais tem afinidade por penicilinas, cefalosporinas, monobactam, carbenicilina e cefepime, todavia, as oxacilinases (OXA) integrantes da classe D são reconhecidas pelos autores como menos importantes quando comparadas com as primeiras e estão associadas a quadros de resistência a carbapenêmicos, cefalosporinas e cloxacilina (BUSH; JACOBY, 2010).

3.4.3.1.2 Classe B – Grupo III

A classe B, também representada pelo grupo III utiliza o zinco como cofator (BERTONCHELI; HÖENER, 2008) e são inibidas pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou por compostos derivados do ácido tiolático (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). Além disso, possuem como característica funcional a potente atividade de hidrolisar todos os betalactâmicos e inibidores de betalactamases com exceção do aztreonam (MENDES *et al*, 2006). Essas podem ser produzidas intrinsecamente ou codificadas por elementos móveis (íntegros, transposons e plasmídeos), os quais são identificados por genes IMP, VIM, CcrA, IND, CAU, GOB, FEZ, CphA, Sfh, GIM, SIM, SPM, AIM, KHM, TBM e NDM (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; MENDES *et al*, 2006).

3.4.3.1.3 Classe C – Grupo I

A classe C ou grupo I é composto por enzimas que hidrolisam cefamicinas (cefexitina e cefotetan), oximiino-cefalosporinas (ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona) e monobactâmicos (como o aztreonam) em menor nível. Ainda estão associadas a atividades hidrolíticas de aminopenicilinas inibidoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL) (amoxicilina com ácido clavulânico, ampicilina e sulbactam) (SANTIAGO, *et al.* 2016). Philippon, Arlet, Jacoby (2002) relatam o gene cromossomal *Escherichia coli* *blaAmpC* como o principal identificador da cefalosporinase, embora outras enzimas também sejam

descritas como CMY, FOX, MIR, P99, ACT, e GCI (PHILIPPON; ARLET; JACOBY, 2002).

3.4.3.1.4 Grupo IV

As betalactamases do grupo IV não foram classificadas em 1995. O estudo dessas enzimas ainda é incompleto, tornando-se inviável sua categorização. Porém sabe-se que nessa classe estão inclusas penicilinas que não são inibidas pelo ácido clavulânico (BUSH; JACOBY, 2010).

3.4.4 Proteção e bloqueio do sítio alvo do antibacteriano

Diferentes táticas evolutivas foram desenvolvidas pelas bactérias para diminuir a afinidade dos antibacterianos nos seus sítios de ação. A proteção do alvo aferida por genes MGEs codificadores de proteínas protetoras é um mecanismo de resistência já relatado em fármacos como as tetraciclinas, fluoroquinolonas e ácido fusídico. Entretanto, a modificação do sítio de destino é a estratégia mais encontrada, e afeta quase todas as famílias de antimicrobianos. Essas podem consistir em mutações pontuais dos genes que codificam o alvo de ligação, atividades enzimáticas localizadas e substituição da passagem do sítio original (MUNITA; ARIAS, 2016).

4 METODOLOGIA

4.1 Local de estudo e colheita das amostras

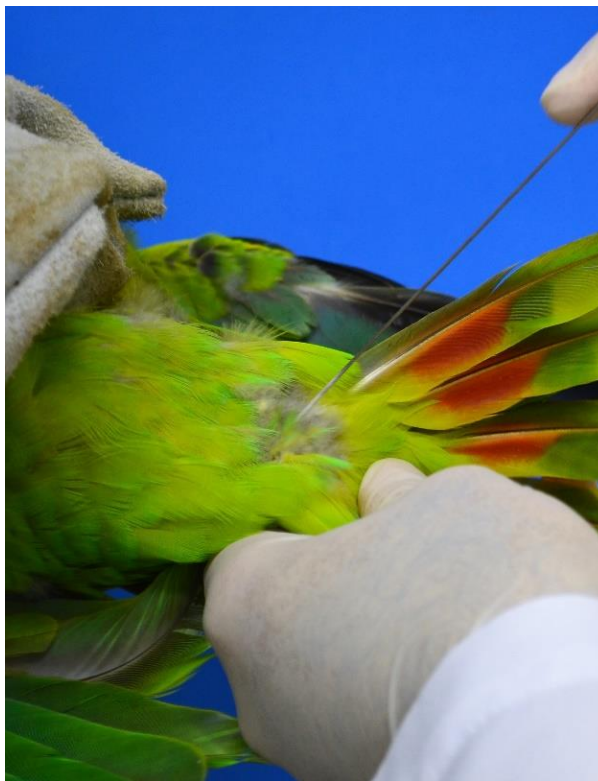
O trabalho foi realizado durante os meses de outubro e novembro do ano de 2018 no Centro de Triagem de Animais Silvestres da Paraíba (CETAS-PB), localizado na Floresta Nacional da Restinga de Cabedelo (PB) (7°03'46.9" S, 34°51'22.0" O), sob a aprovação do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), N° 65316-1, data de emissão: 02/10/2018 (Anexo I e III). Segundo a Instrução Normativa N° 179, de 25 de junho de 2008, o órgão gerenciado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) tem a função de triar, reabilitar e destinar animais silvestres provenientes de ações fiscalizatórias, resgates ou entrada voluntária de particulares.

Foram colhidas amostras da microbiota cloacal em duplicata de trinta aves da ordem Psittaciforme recém-resgatadas ou em estágio de reabilitação (Tabela 3). As espécies foram capturadas de seus recintos com auxílio de um puçá de malha de polipropileno e contidas manualmente para posterior identificação, avaliação clínica e colheita do material biológico (Imagem 1). Para a obtenção das amostras bacterianas, *swabs* estéreis do tipo uretral foram utilizados e acondicionados em tubos de vidro contendo 4 mL cada de caldo *MacConkey* e STGG - *Skim Milk, Tryptone, Glucose and Glycerin*. Todo conteúdo foi armazenado em caixa térmica e transportado até o Núcleo de Medicina Tropical (NUMETROP) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba, Campus I.

Tabela 3. Espécies e número de aves da ordem Psittaciforme coletadas (Anexo II).

ESPÉCIE	NOME POPULAR	Nº DE AVES
<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio Verdadeiro	10
<i>Amazona amazonica</i>	Papagaio do Mangue	2
<i>Amazona festiva</i>	Papagaio da Várzea	1
<i>Ara ararauna</i>	Arara Canidé	3
<i>Ara chloropterus</i>	Arara Vermelha	3
<i>Ara macaw</i>	Arara Macao	1
<i>Diopsittaca nobilis</i>	Maracanã Nobre	5
<i>Eupsittula aurea</i>	Periquito Rei	1
<i>Eupsittula cactorum</i>	Periquito da Caatinga	1
<i>Forpus xanthopterygius</i>	Periquito Tuim	1
<i>Psittacara leucophthalmus</i>	Periquitão Maracanã	1
<i>Thectocercus acuticaudatus</i>	Aratinga de Testa Azul	1
		Total: 30

Imagem 1: Colheita da microbiota cloacal em Papagaio Verdadeiro (*Amazona aestiva*).



FONTE: Elaborado pelo autor.

4.2 Cultivo e isolamento

As amostras mantidas em STGG tiveram seu processamento inicializado em até duas horas após colheita e as mantidas em Caldo MacConkey foram incubadas à temperatura de 37°C durante 24 horas. Em ambas as situações, após homogeneização, 100 µL foram semeados em placas contendo ágar MacConkey acrescido de antimicrobianos seletivos: (i) ceftriaxona 8 µg/mL; (ii) imipenem 1 µg/mL e (iii) polimixina B 3,5 µg/mL, e cultivadas à 37°C por 24 horas. As características morfológicas das colônias foram observadas e colônias representativas foram, posteriormente transferidas para meio TSA (*Tryptic Soy Agar*) também acrescido dos mesmos antimicrobianos de sua placa origem. Todos os isolados tiveram exemplares armazenados em tubos de criopreservação estéreis contendo solução de leite desnatado, água destilada e glicerina a 15%, para sequencialmente serem preservados sob temperatura de -80°C em ultrafreezer.

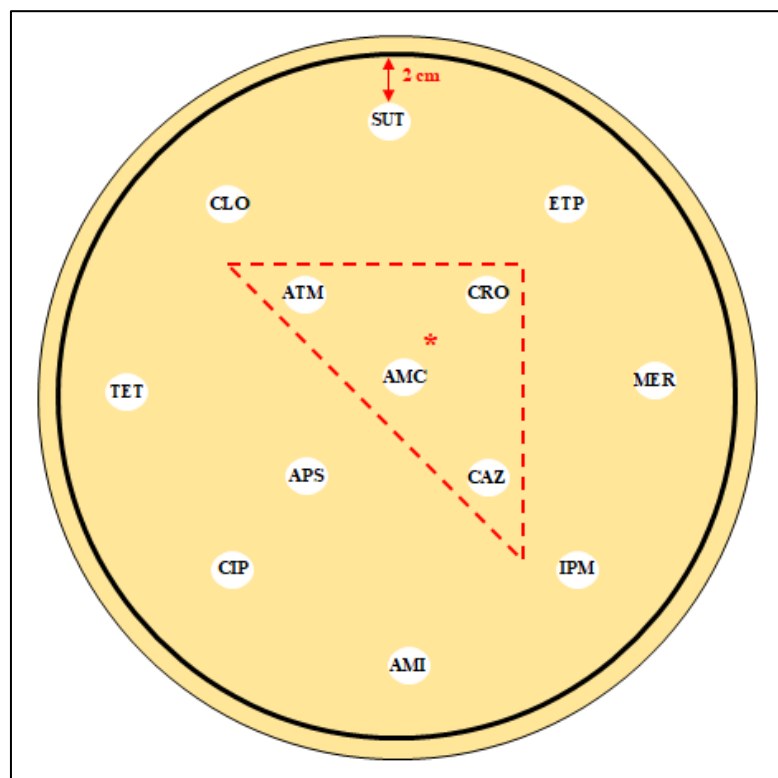
4.3 Identificação fenotípica

A fenotipagem dos microrganismos isolados foi realizada através de testes bioquímicos laboratoriais dos tipos sólido (citrato Simmons, TSI - *Triple Sugar Iron Agar*, LIA - *Lysine Iron Agar*, uréia e fenilalanina) e semissólido (MIO - *Motidad, Indol, Ornitina*). Esses foram distribuídos em tubos de vidro estéreis e após a inoculação do material biológico, mantidos sob temperatura de 37°C durante 24 horas em estufa microbiológica. Posteriormente, foram avaliadas características como: liberação de gás, fermentação da lactose, fabricação de H₂S (sulfeto de hidrogênio), degradação da uréia, produção de indol, mobilidade bacteriana, descarboxilação da ornitina, desaminação ou descarboxilação da lisina, utilização do citrato de sódio como fonte de carbono e a capacidade de desaminação oxidativa da fenilalanina (MACHADO *et al.*, 2016).

4.4 Perfil de sensibilidade antimicrobiana

O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi estabelecido através do método qualitativo de disco difusão em ágar Muller-Hilton seguindo os parâmetros estabelecidos pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute – CLSI* (2012), onde discos contendo antimicrobianos foram adicionados em placas inoculadas e após 16-20 horas os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados para posterior classificação das cepas em resistentes, intermediárias ou sensíveis (*Clinical & Laboratory Standards Institute – CLSI*, 2017). Também foi realizado o teste fenotípico como indicativo de produção da enzima ESBL (*Extended-Spectrum Beta-Lactamase*). O teste foi realizado utilizando discos de cefalosporinas de terceira geração (ceftriaxona 30MCG e ceftazidima 30MCG), e monobactâmico (aztreonam 30MCG) próximos a um disco central de amoxicilina (30MCG) + ácido clavulânico, para a constatação de zonas fantasmas, também denominadas “*Ghost Zone*” (*Clinical & Laboratory Standards Institute – CLSI*, 2017) (Figura 3). Conjuntamente, para estabelecer o controle de qualidade, a cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27833 foram submetidas às mesmas condições dos isolados testes.

Figura 3: Distribuição dos discos de antimicrobianos em ágar Muller-Hilton.



LEGENDA: **SUT**: sulfazotrim (25MCG); **ETP**: ertapenem (10MCG); **MER**: meropenem (10MCG); **IPM**: imipenem (10MCG); **AMI**: ampicilina (30MCG); **CIP**: ciprofloxacina (5MCG); **TET**: tetraciclina (30MCG); **CLO**: cloranfenicol (30MCG); **CRO**: ceftriaxona (30MCG); **CAZ**: ceftazidima (30MCG); **APS**: ampicilina + sulbactam (20MCG); **ATM**: aztreonam (30MCG) e **AMC**: amoxicilina + ác. clavulânico (30MCG). * Teste fenotípico de disco aproximação para detecção da enzima ESBL (*Extended-Spectrum Beta-Lactamase*). FONTE: Elaborado pelo autor.

4.5 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Para o processamento molecular, as amostras foram transportadas sob refrigeração até o Laboratório de Produtos de Origem Animal (LAPOA) da Universidade Federal da Paraíba, Campus II – Areia, Departamento de Zootecnia, setor de Biologia Molecular.

4.5.1 Extração e quantificação do material genético

O DNA bacteriano total foi extraído através da técnica modificada descrita por Sambrook, (1989), onde amostras dos microrganismos foram adicionadas em tubos de vidro contendo 3 mL de caldo LB (*Luria-Bertani*) e homogeneizadas durante 12 horas em incubadora de agitação. Em seguida 1,4 mL da solução de cada frasco foi depositada em *ependorfs* RNAase e DNAase *free* e centrifugada à 14.000 rpm por 15 minutos sob temperatura de 4°C. Após a visualização do *pellet* o sobrenadante foi descartado e 500 µL de tampão TE (*Tris* HCl 1M, pH 8,0; EDTA 0,5M, pH 8,0), 10 µL de lisozima (10 mg/mL) e 10 µL de proteinase K (5 mg/mL) foram pipetados nos mesmos tubos, homogeneizados em vórtex e incubados a 60°C em banho Maria durante duas horas. Posteriormente, os mesmos foram acrescidos de 100 µL de tampão STE (*Tris* HCl 1M, pH 8,0; EDTA 0,5M, pH 8,0; NaCl 5M) e mantidos sob temperatura de 65°C por 15 minutos em estufa. Em seguida, as alíquotas permaneceram durante cinco minutos em temperatura ambiente e cinco minutos submergidas em gelo, para subsequente adição de 130 µL de acetato de amônia (7,5M) e retorno ao gelo por mais 15 minutos. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por cinco minutos e 600 µL do sobrenadante foram transferidos para novos tubos, os quais também foram adicionados o mesmo volume (600µL) de fenol clorofórmio : álcool isoamílico e homogeneizados lentamente por inversão. Após a centrifugação de 14.000 rpm por cinco minutos, aproximadamente 400 µL do sobrenadante foi transferido junto a 420 µL de etanol absoluto gelado para um novo *ependorff* e mantidos sob temperatura de -80°C por 30 minutos. Seguidamente as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o excesso de etanol volatilizado. O *pellet* foi recuperado com a adição de 30 µL de água ultrapura e as amostras incubadas sob temperatura de -20°C durante 12 horas. Para a quantificação do material extraído foi utilizado o aparelho de espectrofotometria *Colibri* (*Titertek Berthold*, Alemanha), onde foi avaliada a razão entre a absorbância dos comprimentos de onda entre nucleotídeos e proteína e a concentração de pureza da amostra.

4.5.2 Genes codificadores de resistência a betalactamases, carbapenemases e colistina

Os genes codificadores de resistência foram pesquisados através da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional, os oligonucleotídeos iniciadores utilizado

foram: betalactamases - CTX-M, carbapenemases - NDM e KPC e colistina - MCR-1 como detalha a Tabela 4. A reação de PCR foi preparada em capela de fluxo laminar, sendo composta de 22,5 µL de PCR *Supermix* (Invitrogen, USA), 0,5 µL de cada oligonucleotídeos iniciador e 1,5 µM de DNA (concentração de 100 ng), totalizando o volume final de 25 µL, os quais foram submetidos ao aparelho de termociclagem *Biometra Tadvanced* (Analytik jena, Alemanha). Os produtos da amplificação foram separados por meio de eletroforese (80 volts por 60 min) em gel de agarose a 1,5% (Kasvi, Brasil), em tampão TAE 50X. Foram depositados em cada poço o volume de 5 µL e para a visualização das bandas foi utilizado o aparelho de interpretação de imagens fluorescentes ou dados colorimétricos *Gel Logic 212 Pro* (Carestream, USA)

Tabela 4: Oligonucleotídeos iniciadores e condições de amplificação dos genes codificadores de betalactamases (CTX-M), carbapenemases (NDM e KPC) e colistina (MCR-1).

GENE CODIFICADOR DE RESISTÊNCIA A BETA-LACTAMASES				
<i>Gene alvo</i>	<i>Sequências (5-3')</i>	<i>Amplicon (PB*)</i>	<i>CT</i>	<i>Referência</i>
<i>bla</i> CTX-M F	SCSATGTGCAGYACCAGTAA	554	1	LIU <i>et al.</i> , 2015
<i>bla</i> CTX-M R	CCGCRATATGRTTGGTGGTG			
GENES CODIFICADORES DE RESISTÊNCIA A CARBAPENEMASES				
<i>Gene alvo</i>	<i>Sequências (5-3')</i>	<i>Amplicon (PB*)</i>	<i>CT</i>	<i>Referências</i>
<i>bla</i> NDM F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621	2	POIREL <i>et al.</i> , 2011
<i>bla</i> NDM R	CGGAATGGCTCATCACGATC			
<i>bla</i> KPC-2 F	TCGCCGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	800	3	HOSSAIM <i>et al.</i> , 2004
<i>bla</i> KPC-3 R	CAATCCCTCGAGCGCGAGTC			
GENE CODIFICADOR DE RESISTÊNCIA A COLISTINA				
<i>Gene alvo</i>	<i>Sequências (5-3')</i>	<i>Amplicon (PB)</i>	<i>CT</i>	<i>Referência</i>
<i>bla</i> MCR-1 F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	343	4	LIU <i>et al.</i> , 2015
<i>bla</i> MCR-1 R	ATTTCTGACCGCATTTCCAT			

PB*: pares de base. **CT:** condições de termociclagem. **1** = 94°C 3 min; 35 ciclos de 94°C 30 seg, 55°C 30 seg, 72°C 45 seg; e 72°C 5 min. **2** = 94°C 10 min; 36 ciclos de 94°C 30 seg, 52°C 40 seg, 72°C 50 seg; e 72°C 5 min. **3** = 95°C 7 min; 35 ciclos de 95°C 40 seg, 54°C 45 seg, 72°C 40 seg e 72°C 10 min. **4** = 94°C 15 min; 25 ciclos de 94°C 30 seg, 59°C 90 seg, 72°C 60 seg; 72°C 10 min.

4.6 Diversidade genotípica das cepas de *Escherichia coli*

Para a tipificação dos isolados de *Escherichia coli* KPC positivas foi utilizada a técnica de REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic Sequence based PCR*), descrita por Van der Zee *et al.* (1999), onde 25 µL de reação para o PCR foram preparados. Cada mistura continha 10 pmol de primer RW3A 5' - TCGCTCAAAACAACGACACC - 3', 5 U de Taq, 10 nM de Desoxirribonucleico Fosfatados (dNTP), 50 mM de MgCl₂, Tampão Taq 10X e subsequentemente foram adicionados 50 mg de DNA molde e 25 µL q.s.p de água ultra pura. A solução foi submetida à termociclagem no aparelho *Biometra Tadvanced* (*Analytik jena*, Alemanha) sob as condições de 94°C/3min, 30 ciclos: 94°C/1min; 50°C/1 min; 72°C 2min e 72°C 5min e os produtos foram separados por eletroforese em gel de Agarose a 1,5% (*Kasvi*, Brasil), corados com brometo de etílico, submergidos em tampão TAE 50X durante 90 minutos sob 80 volts para posterior leitura no aparelho *Gel Logic 212 Pro* (*Carestream*, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 30 animais coletados, 19 (63,3%) foram positivos para pelo menos um dos meios de cultivo suplementados usados no presente estudo. Em relação às amostras positivas, 18 (60%) delas originaram de caldo MacConkey e 11/90 (36,6%) de caldo STGG. Essa discrepância pode estar relacionada ao período mais prolongado de incubação (24-48 horas) do Caldo MacConkey, o qual favoreceu o crescimento bacteriano. Quanto aos isolamentos nas placas suplementadas com antimicrobianos, foi observada maior frequência nas placas contendo polimixina B 42 (70%).

A partir das culturas positivas, foram isoladas 60 colônias, das quais 43 (71,7%) foram identificadas como *Escherichia coli*, não sendo possível a identificação definitiva de 17 (28,3%) cepas com base no painel bioquímico utilizado no presente estudo. *Escherichia coli* pertence à microbiota comensal do intestino dos animais, entretanto, o real papel protooperativo desse microrganismo no funcionamento entérico das aves é pouco conhecido. Sabe-se que, em aves silvestres, algumas linhagens patogênicas de *Escherichia coli* podem levar a quadros clínicos severos. Sabe-se que, em aves silvestres, algumas linhagens patogênicas podem levar a quadros clínicos severos. Estudos indicam maior prevalência da bactéria na colonização intestinal de psitacídeos cativos comparativamente a animais de vida livre, explicada possivelmente por fatores relacionados à alimentação, higienização dos recintos e uso de antimicrobianos (LOPES *et al.*, 2016).

Quanto aos resultados dos antibiogramas, as cepas investigadas apresentaram maior taxa de susceptibilidade ao aztreonam - 30MCG (95,2%), seguido do sulfazotrim - 25MCG (93,0%), imipenem - 10MCG (93,0%), amicacina - 30MCG (93,0%), tetraciclina - 30MCG (93,0%), cloranfenicol - 30MCG (93,0%) e ceftriaxona - 30MCG (93,0%). As maiores taxas de resistência foram observadas para ciprofloxacina - 5MCG (11,7%), ertapenem - 10MCG (9,3%) e ceftazidima - 30MCG (9,3%). Além disso, nenhuma cepa foi positiva ao teste de disco-aproximação, portanto, não havendo indicativo de produção de betalactamases de espectro estendido (ESBL).

O aztreonam é um monobactâmico pertencente à classe dos betalactâmicos monocíclicos, sua atividade antimicrobiana atinge somente bactérias anaeróbicas Gram-negativas, sendo uma excelente opção para o tratamento de infecções causadas por *Escherichia coli*. Embora os resultados obtidos pelo presente estudo indiquem boa atividade

do fármaco, *Karlowsky et al.* (2017) sobre a redução da susceptibilidade da família Enterobacteriaceae a esse antimicrobiano, principalmente devido a disseminação horizontal de genes de resistência através plasmídeos.

A resistência observada à ciprofloxacina pode ser relacionada a outros estudos, que mencionam as fluorquinolonas entre os grupos de antimicrobianos aos quais se tem observado um aumento significativo de resistência, sendo *Escherichia coli* uma espécie importante na manutenção e disseminação do quadro (VOLCÃO *et al.*, 2016). Mecanismos como a mutações em genes codificadores da Topoisomerase II (*gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*), localizados em sítios/regiões alvo (QRDR); transmissão de genes plasmidiais (PMQR); presença dos genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC* e *qnrD*), *oqxAB*, *qepA*, *aac* e (β' -) *Ib-rc*; além de mutações nas porinas constituintes da parede celular bacteriana, são os principais mecanismos envolvidos na resistência às fluoroquinolonas em infecções humanas (DINIZ; SANTOS, 2017).

Dentre os marcadores de resistência antimicrobiana investigados no presente estudo, apenas o *blaKPC* foi detectado. As 13 cepas positivas originaram de sete espécies de aves distintas: um Papagaio do Manguê (*Amazona amazônica*), uma Arara Macaw (*Ara macaw*), uma Arara Vermelha (*Ara chloropterus*), uma Arara Canidé (*Ara ararauna*), dois Papagaios Verdadeiros (*Amazona aestiva*) e um Papagaio da Várzea (*Amazona festiva*) de acordo com o quadro 1.

Quadro 1. Resultados da similaridade genotípica de *Escherichia coli* KPC positivas encontradas no estudo.

Nº	ESPÉCIE	ID DO ANIMAL	CRESC	PLACA	BACT ISOLADA	GENÓTIPO	PCR			
							CTX-M	NDM	KPC	MCR
01	<i>Ara ararauna</i>	ARA 2	STGG	Poli B	<i>E. coli</i>	II	-	-	+	-
02	<i>Ara ararauna</i>	ARA 2	STGG	Poli B	<i>E. coli</i>	II	-	-	+	-
03	<i>Ara ararauna</i>	ARA 2	STGG	Poli B	<i>E. coli</i>	II	-	-	+	-
04	<i>Ara macaw</i>	ARA 4	STGG	Poli B	<i>E. coli</i>	III	-	-	+	-
05	<i>Ara chloropterus</i>	ARA 5	STGG	Poli B	<i>E. coli</i>	IV	-	-	+	-
06	<i>Ara chloropterus</i>	ARA 5	STGG	Poli B	<i>E. coli</i>	II	-	-	+	-
07	<i>Ara chloropterus</i>	ARA 5	STGG	Poli B	<i>E. coli</i>	II	-	-	+	-
08	<i>Amazona aestiva</i>	PAP 8	STGG	Poli B	<i>E. coli</i>	I	-	-	+	-
09	<i>Amazona aestiva</i>	PAP 8	MAC	Imi	<i>E. coli</i>	I	-	-	+	-
10	<i>Amazona festiva</i>	PAP 9	STGG	Poli B	<i>E. coli</i>	I	-	-	+	-
11	<i>Amazona amazonica</i>	PAP 11	STGG	Poli B	<i>E. coli</i>	I	-	-	+	-
12	<i>Amazona amazonica</i>	PAP 11	STGG	Poli B	<i>E. coli</i>	I	-	-	+	-
13	<i>Amazona aestiva</i>	PAP 12	MAC	Imi	<i>E. coli</i>	I	-	-	+	-

LEGENDA: BACT: bactéria; CRESC: caldo de crescimento; CTX-M: cefotaximase isolada em Munich; ID: identificação; KPC: *Klebsiella Pneumoniae* carbapenemase; MAC: caldo MacConkey; MCR: Mobilized colistin resistance; Nº: número; NDM: New Delhi metallo- β -lactamase; PCR: polymerase chain reaction; PLACA: cultivo bacteriano contendo ágar MacConkey mais antimicrobiano; STGG: Skim milk, Tryptone, Glucose and Glycerin. FONTE: Dados da pesquisa.

As enzimas KPC pertencentes ao grupo das carbapenemases da classe A, compostas por 265 a 269 aminoácidos e possuem uma serina em seu sítio ativo. Historicamente, sua nomenclatura está associada ao seu primeiro relato na espécie *Klebsiella pneumoniae*. Sendo, a KPC-2 e KPC-3 as mais prevalentes em isolamentos clínicos de pacientes hospitalizados (PORRECA; SULLIVAN; GALLAGHER, 2018).

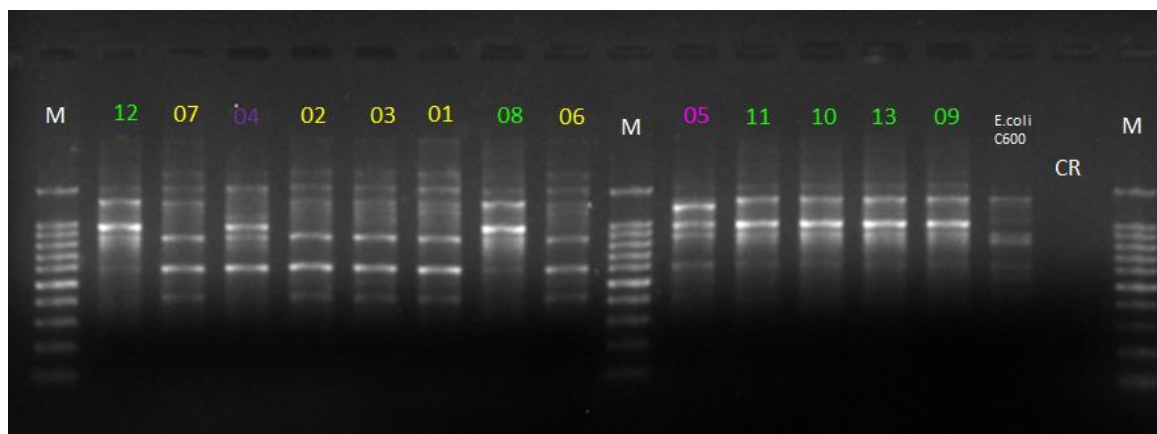
Os resultados sugerem que os psitacídeos em cativeiro podem apresentar um papel importante na manutenção dos ciclos das colibaciloses entéricas resistentes a antimicrobianos, com potencial impacto na saúde pública. As rotas epidemiológicas de transmissão desses microrganismos são pouco conhecidas, todavia, acredita-se que esses animais atuam como vetores biológicos em potencial, principalmente quando são capturados dos seus ambientes naturais de origem e levados ao convívio humano (WANG *et al.*, 2017). Porém, é válido ressaltar que o quadro de zoonose também é comum, principalmente quando relacionado com amostras ambientais (CAUMO *et al.*, 2010).

Poucos estudos relataram os psitacídeos como carreadores de genes bacterianos de resistência, sendo este o primeiro relato no estado da Paraíba. De acordo com estudos anteriores, o gene KPC não foi detectado em cepas de aves pertencentes às ordens Columbiformes, Passeriformes, Charadriiformes, Accipitriformes, Falconiformes e Strigiformes (ROUFFAER *et al.*, 2014). Durante a realização da pesquisa, foi vista uma quase escassez de informações envolvendo aves silvestres como portadoras dos genes codificadores de resistência. As análises geralmente estacionam nas características fenotípicas de sensibilidade antimicrobiana em disco difusão ou relatam apenas genes ligados aos níveis de virulência de cepas isoladas, o que impossibilita um aprofundamento na construção literária, porém, viabiliza a fundamentação ideológica de novas pesquisas.

Os resultados de similaridade genotípica obtidos através da REP-PCR indicam quatro perfis distintos de *Escherichia coli* portadoras do gene *blaKPC* (genótipo I: amostras 08, 09, 10, 11, 12 e 13; genótipo II: amostras 01, 02, 03, 06 e 07; genótipo III: amostra 04 e genótipo IV: amostra 05) (Imagem 2). É válido ressaltar que em uma ave da espécie *Ara chloropterus* (ARA 5/ genótipo IV: N° 05 e genótipo II: N° 06) possuiu duas variantes de *Escherichia coli*, onde uma delas também foi detectada na espécie *Ara ararauna* (ARA 2/ genótipo II: N° 01, 02 e 03). Esses achados indicam que há possibilidade do gene de resistência estar localizado em elementos móveis, favorecendo a disseminação da resistência entre linhagens diferentes de enterobactérias no ambiente intestinal e a possibilidade de transmissão horizontal. Outra importante observação foi que as variantes de N° 09 e 13

(genótipo I) encontradas em animais diferentes da espécie *Amazona aestiva* foram às únicas pré-enriquecidas em caldo MacConkey e selecionadas em placas contendo meio MacConkey suplementadas com imipenem, indicando que cepas KPC resistentes ao imipenem sejam provavelmente mais exigentes.

Imagem 2: Similaridade genotípica de *Escherichia coli* KPC isoladas de psitacídeos resgatados do tráfico, mantidos na triagem do Centro de Animais Silvestres da Paraíba, Brasil.



LEGENDA: genótipo I: amostras 08, 09, 10, 11, 12 e 13; genótipo II: amostras 01, 02, 03, 06 e 07; genótipo III: amostra 04 e genótipo IV: amostra 05. FONTE: Dados da Pesquisa.

6 CONCLUSÕES

a) Considerando os perfis de sensibilidade de *Escherichia coli* originadas da microbiota cloacal de psitacídeos silvestres cativos, fica clara a relevância no monitoramento dessas espécies, devido à presença de isolados resistentes a antimicrobianos utilizados no tratamento clínico de bacterioses humanas e veterinárias. Onde o aztreonam foi o antimicrobiano que apresentou os maiores valores de sensibilidade, diferente da ciprofloxacina que se destacou com a prevalência de cepas resistentes.

b) A presença do gene *blaKPC* nos indivíduos confirma a importância do manejo sanitário em centros de reabilitações de animais silvestres. Tais espécies podem agir como reservatórios e disseminadoras de genes de resistência. Nesse contexto, sendo esse o primeiro trabalho que relata a presença do gene em membros da ordem Psittaciformes no estado da Paraíba - Brasil, a pesquisa alerta os órgãos de segurança sanitários do estado sobre os riscos epidemiológicos da transmissão entre animais originados do tráfico e humanos.

REFERÊNCIAS

1º RELATÓRIO NACIONAL SOBRE O TRÁFICO DE FAUNA SILVESTRE. Disponível em: <http://www.renctas.org.br/wp-content/uploads/2014/02/REL_RENCTAS_pt_final.pdf>. Acesso em: 23 de junho de 2018.

AMBLER, R. P. The structure of β -lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. v. 289. n. 1, 1980. p. 321-331.

ARNOLD, K. E.; WILLIAMS, N. J.; BENNETT, M. Disperse abroad in the land: the role of wildlife in the dissemination of antimicrobial resistance. **Biology Letters**. v. 12, n. 1, 2016. p. 1-8.

BEISSINGER, S. R.; SNYDER, N. F. R. **New World parrots in crisis: solutions from conservation biology**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1992. p.288.

BERTONCHELI, C. M.; HÖRNER, R. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 44. n. 4, 2008. p. 577-597.

BOHNERT, J. A.; SCHUSTER, S.; KERN, W. V. Pimozide inhibits the AcrAB-TolC efflux pump in *Escherichia coli*. **The open Microbiology Journal**. v. 7. n. 1, 2013. p. 83-86.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 54. n. 3, 2010. p. 969-976.

BUSH, K.; JACOBY G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 39, n. 1, 1995. p. 1211-1233.

CAUMO, K.; DUARTE, M.; CARGIN, S. T.; RIBEIRO, V. B.; TASCA, T.; MACEDO, A. J. Resistencia bacteriana no ambiente e implicações na clinica hospitalar. *Revista Liberato*. v. 11. n. 16, 2010. p. 89-97.

CHEN, P.; LI, Y.; ZHAO, L.; HOU, Z.; YAN, H.; HU, B.; LIU, Y.; AZAM, S. M.; ZHANG, Z.; RAHMAN, Z.; LIU, L.; QIN, Y. Genome-wide identification and expression profiling of ATB-Binding Cassete (ABC) transporter gene family in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) reveal the role of AcABCG38 in pollen development. *Frontiers in Plant Science*. n. 2150. v. 8, 2017. p. 1-14.

COSTA, F. J. V.; RIBEIRO, R. E.; SOUZA, C. A.; NAVARRO, R. D. Espécies de aves traficadas no Brasil: uma meta-análise com ênfase nas espécies ameaçadas. **Journal of Social, Technological and Environmental Science**. v. 7. n. 2, 2018. p. 324-346.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. **CLSI Document M07-A9**. 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Seventh Edition Informational Supplement. **CLSI Document M100-S27**. 2017.

DELCOUR, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochim Biophys Acta**. v.1794. n. 5, 2010. p. 808-816.

DINIZ, A M. M.; SANTOS, R. M. C. *Escherichia coli* resistente a ciprofloxacina em pacientes internados. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**. v. 1, n. 7, 2017. p. 20-24.

EISINGER, M. L.; NIE, L.; DORRBAUM, A. R.; LANGER, J. D.; MICHEL, H. The xenobiotic extrusion mechanism of the MATE transporter NorM_PS from *Pseudomonas stutzeri*. **Journal of Molecular Biology**. v. 430. n. 9, 2018. p. 1311-1323.

FAVRETTO, M. A. As aves do período Cretáceo da Era Mesozoica. **Atualidades ornitológicas on-line**. n. 154, 2010. p. 61-63.

FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 25, n. 4, 2012. p. 661-681.

FERNANDO, D. M.; KUMAR, A. Resistance-nodulation-division multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria: role in virulence. **Antibiotics**. v. 2. n. 1, 2013. p. 163-181.

FITZPATRICK, A. W. P.; LLABRÉS, S.; NEUBERGER, A.; BLAZA, J. N.; BAI, X.; OKADA, U.; MURAKAMI, S.; VAN VEEN, H. W.; ZACHARIAE, U.; SCHERES S. H.W.; LUISI, B. F.; DU, D. Structure of the MacAB-TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump. **Nature Microbiology**. v. 2. n. 1, 2017. p. 1-20.

GODOY, S. N. Psittaciformes (Arara, Papagaio, Periquito). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens**. 2º ed. São Paulo: Roca, 2014. p. 222-251.

HICKMAN, R. K.; LEVY, S. B. Evidence that TET protein functions as a multimer in the inner membrane of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. v. 170. n. 4, 1988. p. 1715-1720.

HIDASI, H. W.; HIDASI NETO, J; MORAES, D. M. C.; LINHARES, G. F. C.; JAYME, V. S.; ANDRADE, M. A. Enterobacterial detection and *Escherichia coli* antimicrobial resistance in parrots seized from the illegal wildlife trade. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 44, n. 1, 2013. p. 1-7.

HIGGINS, P. J. **Handbook of Australia, New Zealand & Antarctic birds**.v. 4, 1999. p. 54.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). Instrução Normativa Nº 179, de 25 de junho de 2008. Disponível em: <

http://www.icmbio.gov.br/ran/images/stories/legislacao/IN_IBAMA_179_destina%C3%A7%C3%A3o.pdf>. Acesso em: 11 de julho de 2018.

JOSEPH, L.; TOON, A.; SCHIRTZINGER, E. E.; WRIGHT, T. F.; SCHODDE, R. A revised nomenclature and classification for family-group taxa parrots (Psittaciformes). **Zootaxa**. v. 3204, n. 40, 2012. p. 26-40.

KARLOWSKY, J. A.; KAZMLERCZAK, K. M.; JONGE, B. L. M.; HACKEL, M. A.; SAHM, D. F.; BRADFORD, P. A. In vitro of Aztreonam-Avibactam against Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa isolated by clinical laboratories in 40 countries from 2012 to 2015. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 62. n. 9, 2017. p. 1-13.

KERMANI, A. A.; MACDONALD, C. B.; GUNDEPUDI, R.; STOCKBRIDGE, R. B. Guanidinium export is the primal function of SMR family transporters. **PNAS**. v. 115. n. 12, 2018. p. 3060-3065.

KUMAR, S.; KAKARLA, P.; SHRESTHA, U.; RANJANA, K. C.; RANAWEERA, I.; WILLMON, T. M.; BARR, S. R.; HERNANDEZ, A. J.; VARELA, M. F. Bacterial multidrug efflux pumps of the major facilitator superfamily as targets for modulation. **Infectious Disorders-Drug Targets**. v. 16. n. 1, 2016. p. 28-43.

LEE, J.; SANDS, Z. A.; BIGGIN, P. C. A numbering system for MFS transporter proteins. **Frontiers in Molecular Biosciences**. v. 3. n. 21, 2016. p. 1-13.

LI, Y.; HE, H.; HE, L. F. Genome-wide analysis of the MATE gene family in potato. **Molecular Biology Reports**. v. 46. n. 1, 2019. p. 403-414.

LICARIÃO, M. R.; BEZERRA, D. M. M.; ALVES, R. R. N. Wild birds as pet in Campina Grande, Paraíba State, Brazil: An Ethnozoological Approach. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**. v. 85, n. 1, 2013. p. 201-213.

LIN, J.; NISHINO, K.; ROBERTS, M. C.; TOLMASKY, M.; AMINOV, R. I.; ZHANG, L. Mechanisms of antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**. v. 6, n. 1, 2015. p. 1-3.

LIU, Y. Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R.; YI, L. X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L. F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J. H.; SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 16, n. 2, 2015. p. 161-168.

LIVRO VERMELHO DA FAUNA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, 2016. Disponível em: <

http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoes-diversas/dcom_sumario_executivo_livro_vermelho_ed_2016.pdf>. Acesso em: 29 de agosto de 2018.

LOPES, E. S.; MACIEL, W. C.; ALBUQUERQUE, A. H.; MACHADO, D. N.; BEZERRA, W. G. A.; VASCONCELOS, R. H.; LIMA, B. P.; GONÇALVES, G. A. M.; TEIXEIRA, R. S. C. Prevalence and antimicrobial resistance profile of Enterobacteria isolated from Psittaciformes of illegal wildlife trade. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 43, n. 1313, 2016. p. 1-9.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibiótico e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**. v. 34, n. 1, 2016. p. 77-84.

LU, M. Structures of multidrug and toxic compound extrusion transporters and their mechanistic implications. **Channels**. v. 10, n. 2, 2016. p. 88-100.

MACEDO, M. L. A. P.; CARTAXO, R. S.; ALMEIDA, T. C. C.; SOUZA, L. B. S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M. Mecanismo de resistência e detecção de beta-lactamases. **Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 7, n. 1, 2005. p. 59-63.

MACHADO, D. N.; LOPES, E. S.; ALBUQUERQUE, Á. H.; BEZERRA, W. G. A.; HORN, R. V.; LIMA, S. V. G.; SIQUEIRA, R. A. S.; BELEZA, A. J. F.; OLIVEIRA, F. R.; CARDOSO, W. N.; TEXEIRA, R. S. C. Detecção e avaliação do perfil de sensibilidade antibacteriana de enterobactérias isoladas de periquitos cara-suja (*Pyrrhura griseipectus*) em cativeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 68, n. 6, 2016. p. 1732-1736.

MAGNET, S.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Resistance-Nodulation-Cell Division-Type Efflux Pump Involved in Aminoglycoside Resistance in *Acinetobacter baumannii* Strain BM4454. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, n. 12, 2011. p. 3375-3380.

MENDES, R. E.; CASTANHEIRA, M.; PIGNATARI, A. C. C.; GALES, A. C. Metallo- β -lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 42, n. 2, 2006. p. 103-113.

MUNITA, J. M.; ARIAS C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**. v. 4, n.2, 2016. p. 1-37.

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 47, n. 4, 2011. p. 409-420.

OVCHINNIKOV, V.; STONE, T. A.; DEBER, C. M.; KARPLUS, M. Structure of the EmrE multidrug transporter and its use for inhibitor peptide design. **PNAS**. v. 115, n. 34, 2018. p. 1-10.

PAGANO, I. S. A.; SOUSA, A. E. B. A.; Wagner, P. G. C.; Ramos, R. T. C. Aves depositadas no Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA na Paraíba: uma amostra do tráfico de aves silvestres no estado da Paraíba. **Ornithologia**. v. 2, n. 3, 2009. p. 132-144.

PAO, S. S.; PAULSEN, I. T.; SAIER JR, M. H. Major facilitator superfamily. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 62. n. 1, 1998. p. 1-34.

PHILIPPON, A.; ARLET, G.; JACOBY, G. A. Plasmid-determined AmpC- type β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46. n. 1, 2002. p. 1-11.

POIREL, L.; SCHRENZEL, J.; CHERKAoui, A.; BERNABEU, S.; RENZI, G.; NORDMANN, P. Molecular analysis of NDM-1-producing enterobacterial isolates from Geneva, Switzerland. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 66, n. 8, 2011. p. 1730-1733.

PORRECA, A. M.; SULLIVAN, K. V.; GALLAGHER, J. C. The epidemiology, evolution, and treatment of KPC-producing organisms. **Current Infectious Disease Reports**. v. 6. n. 20, 2018. p. 1-13.

RICHMOND, M. H.; SYKES, R. B. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological roles. **Advances in Microbial Physiology**. v. 9. n. 1, 1973. p. 31-88.

ROUFFAER, L. O.; HAESBROUCK, F.; MARTEL, AN, M. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated from feces of Falconidae, Accipitridae, and Laridae in bird rescue centers in Belgium. **Journal of Wildlife Diseases**. v. 4. n. 50, 2014. p. 957-960.

SAIDENBERG, A. B. S.; GILARDI, J. D.; MUNN, C.; KNOBL, T. Evaluation of fecal Gram stains and prevalence of endoparasites in free-living macaws. **Atlas de Saúde Ambiental**. v. 3, n. 3, 2015. p. 3-11.

SALEH, M.; BAY, D. C.; TURNER, R. J. Few conserved amino acids in the small multidrug resistance transporter EmrE influence drug polyselectivity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 68. n. 8, 2018. p. 1-12.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning. A laboratory manual**. 2^o ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p. 202.

SANCHES, L. A.; GOMES, M. S.; TEIXEIRA, R. H. F.; CUNHA, M. P. V.; OLIVEIRA, M. G. X.; VIEIRA, M. A. M.; GOMES, T. A. T.; KNOBL, T. Captive wild birds as reservoirs of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC). **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 48. n. 4, 2017. p. 760-763.

SANTANA, L.L.; CRUZ, D. C. B.; MARBACH, P. A. S. Caracterização da estrutura primária dos parálogos da FTSH do filo cyanobacteria. **Ciência & Tecnologia**. v. 8. n. especial, 2016. p. 1.

SANTIAGO, G. S.; MOTTA, C. C.; BRONZATO, G. F.; GONÇALVES, D.; SOUZA, M. M. S.; COELHO, I. S.; FERREIRA, H. N.; COELHO, S. M. O. Produção de β -lactamases do tipo AmpC em Enterobacteriaceae. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 38. n. 3, 2016. p. 17-30.

SANTOS, I. A. L.; NOGUEIRA, J. M. R.; MENDONÇA, F. C. R. Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 47. n. 1-2, 2015. p. 5-12.

SCHINDLER, H.; ROSENBUSCH, J. P. Matrix protein from *Escherichia coli* outer membranes forms voltage-controlled channels in lipid bilayers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 75. n. 8, 1978. p. 3751-3755.

SILVA, F. L.; PALÁCIO, S. B.; GARCIA, J. E.; CAVALCANTI, I. M. F. Dissemination of multidrug-resistant bacteria in birds. **Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences**. v. 3, n. 4, 2018. p. 1-4.

SOUZA, T. O.; VILELA, D. A. R.; CÂMARA, B. G. O. Pressões sobre a avifauna brasileira: Aves recebidas pelo CETAS/IBAMA, Belo Horizonte, Minas Gerais. **Ornithologia**. v. 3, n. 2, 2009. p.132-144.

TOBA, S.; MINATO, Y.; KONDO, Y.; HOSHIKAWA, K.; MINAGAWA, S.; KOMAKI, S.; KUMAGAI, T.; MATOBA, Y.; MORITA, D.; OGAWA, W.; GOTOH, N.; TSUCHIYA, T.; KURODA, T. Comprehensive analysis of resistance-nodulation-cell division superfamily (RND) efflux pumps from *Serratia marcescens*, Db10. **Scientific Reports**. v. 9. n. 1, 2019. p. 1-14.

TORO, M.; RETAMAL, P.; AYERS, S.; BARRETO, M.; ALLARD, M.; BROWN, E. W.; GONZALEZ-ESCALONA, N. Whole-genome sequencing analysis of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* isolates in Chile provides insights into possible transmission between gulls, poultry, and humans. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 82, n. 20, 2016. p. 6223-6232.

TRANSPORTER CLASSIFICATION DATABASE (TCDB). Disponível em: <<http://www.tcdb.org/search/result.php?tc=2.A.1>>. Acesso em: 05 de maio de 2019.

TRINDADE, L. C.; FIGUEIRA, P. T. Perfil de susceptibilidade antibacteriana e produção de hemolisina de enterobactérias de psitacídeos em cativeiro. **Pubvet**. v. 12, n. 3, 2018. p. 1-5.

VAN DER ZEE, U.; VERBAKEL, H.; VAN ZON, J. C.; FRENAY, I.; VAN BELKUM, A.; PEETERS, M.; BUITING, U.; BERGMANS U. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, n. 2, p. 342-351, 1999.

VASCONCELOS, T. C. B.; NOGUEIRA, D. M.; PEREIRA, V. L. A.; NASCIMENTO, R. R.; BRUNO, S. F. *Chamydophila psittaci* em aves silvestres e exóticas: uma revisão com ênfase em saúde pública. **Centro Científico Conhecer**. v. 9, n. 16, 2013. p. 2462-2477.

VIDEVAL, E.; STRANDH, M.; ENGELBRECHT, A.; CLOETE, S.; CORNWALLIS, C. K. Measuring the gut microbiome in birds: comparison of faecal and cloacal sampling. **Molecular Ecology Resources**. v. 21, n. 3, 2018. p. 424-434.

VOLCÃO, L. M.; LACAVA, J. P.; RAMIS, I. B.; RAMOS, D. F.; DAMATI, G. S.; GONÇALVES, C. V.; SILVA, P. E. A.; GROLL, A. V. Fatores associados com a resistência a ciprofloxacina e levofloxacina em bacilos Gram-negativos isolados de infecções do trato urinário. **Revista de Epidemiologia e Controle de infecção**. v. 1, n. 6, 2016. p. 18-23.

WANG, J.; MA, Z. B.; ZENG, Z. L.; YANG, X. W.; HUANG, Y.; LUI, J. H. The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance gene. **Zoological Research**. v. 2. n. 38, 2017. p. 55-80.

WELTE, W.; NESTEL, U.; WACKER, T.; DIEDERICH, S. Structure and function of the porin channel. **Kidney International**. v. 48, n. 1, 1995. p. 930-940.

WRIGHT, T. F.; SCHIRTZINGER, E. E.; MATSUMOTO, T.; EBERHARD, J. R.; GRAVES, G. R.; SANCHEZ, J. J.; CAPELLI, S.; MÜLLER, H.; SCHARPEGGE, J.; CHAMBERS, G. K.; FLEISCHER, R. C. A multilocus molecular phylogeny of the parrots (Psittaciformes): support for a Gondwanan origin during the Cretaceous. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, n. 25, 2008. p. 2141-2156.

YANG, H.; GUO, D.; OBIANOM, O. N.; SU, T.; POLLI, J. E.; SHU, Y. Multidrug and toxin extrusion proteins mediate cellular transport of cadmium. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 314. n. 1, 2018. p. 55-62.

YUHAN, Y.; ZIYUN, Y.; YONGBO, Z.; FUQIANG, L.; QINGHUA, Z. Over expression of AdeABC and AcrAB-TolC efflux systems confers tigecycline resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 49. n. 2, 2016. p. 165-171.

ANEXO I



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 65316-1	Data da Emissão: 02/10/2018 14:19:49	Data da Revalidação*: 02/10/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Gedean Galdino da Cruz Silva	CPF: 076.684.374-28
------------------------------------	---------------------

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Cronograma de atividades - Coletas das amostras biológicas	10/2018	12/2018

Observações e ressalvas

1	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
2	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
3	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
4	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
5	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
6	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Centro de Triagem de Animais Silvestres da Paraíba	Cabedelo-PB	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Municipal

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0653160120181002

Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 65316-1	Data da Emissão: 02/10/2018 14:19:49	Data da Revalidação*: 02/10/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Gedeon Galdino da Cruz Silva	CPF: 076.684.374-28
------------------------------------	---------------------

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Passeridae	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Psittacidae	-

Materiais e Métodos

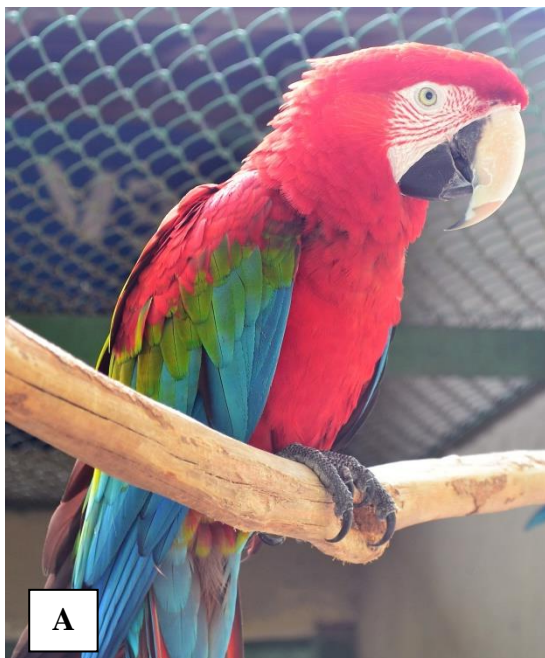
#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Aves)	Fezes

Destino do material biológico coletado

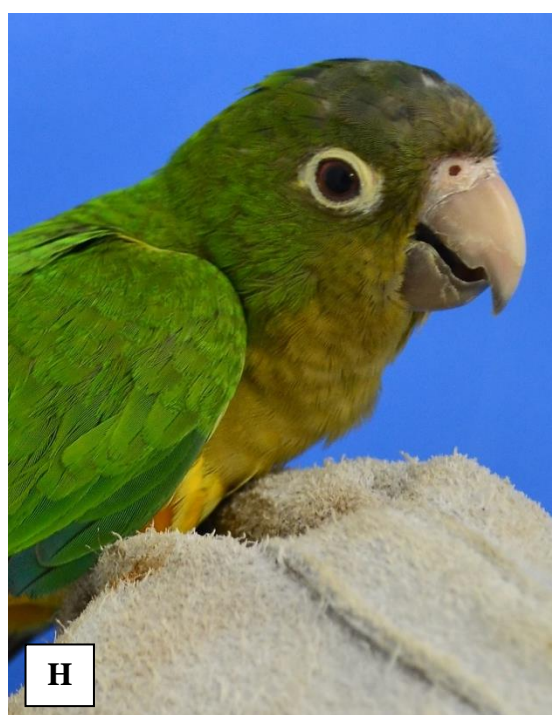
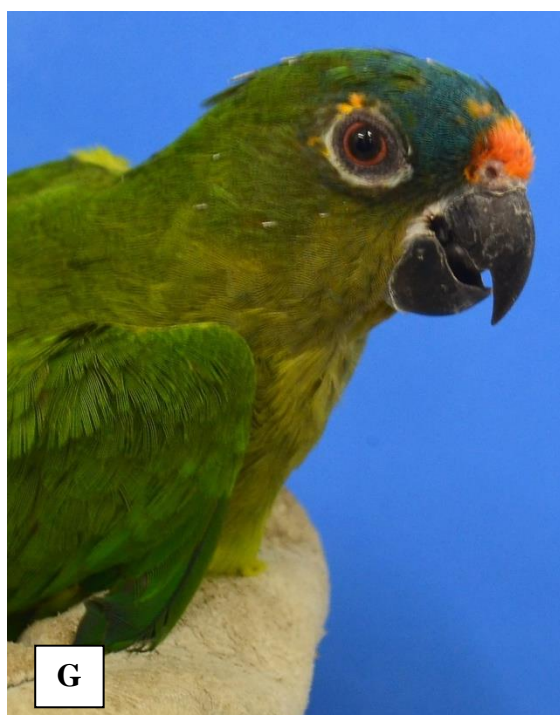
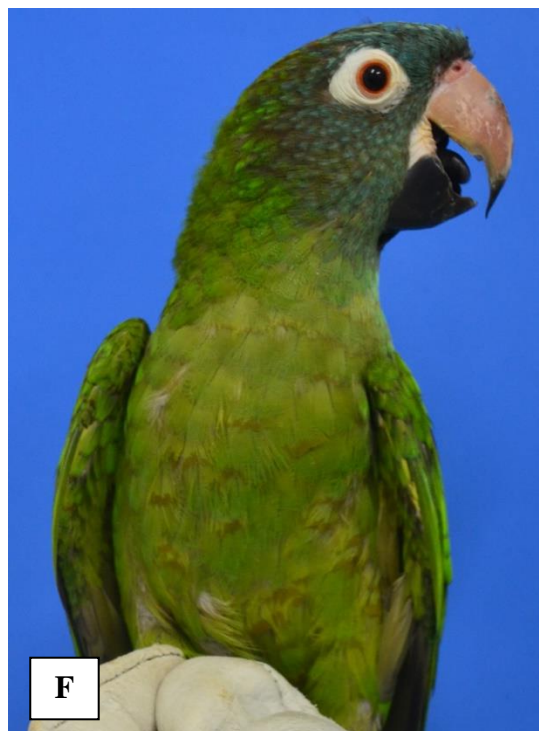
#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA-CAMPUS II	Laboratório
2	UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE/PARAIBA	Laboratório

ANEXO II

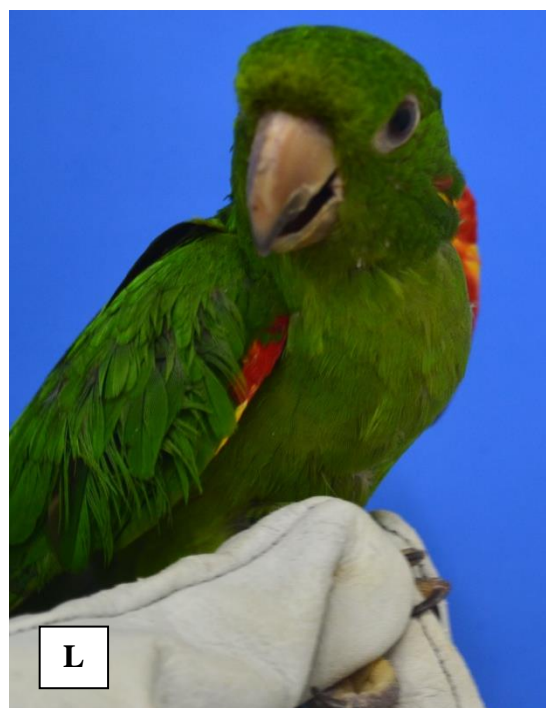
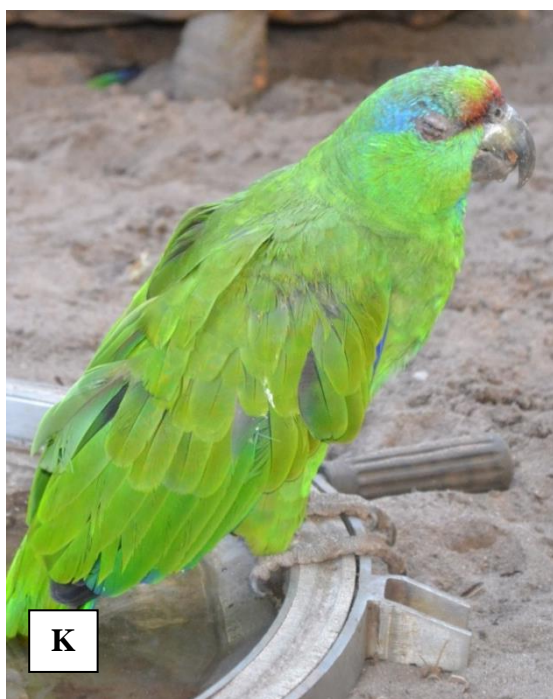
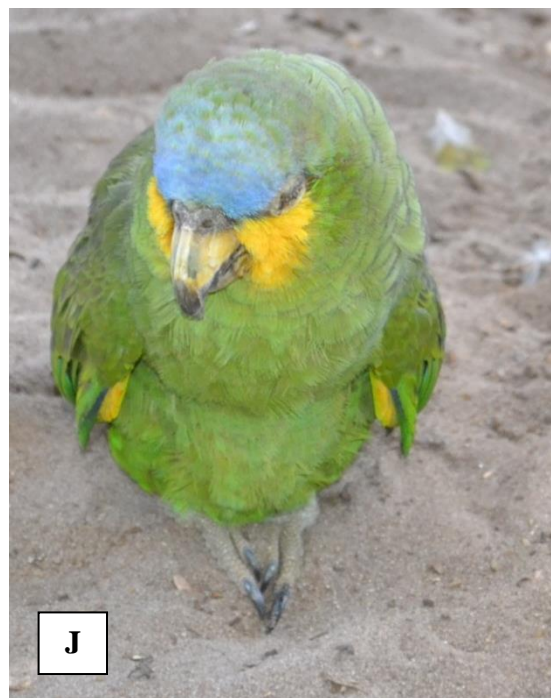
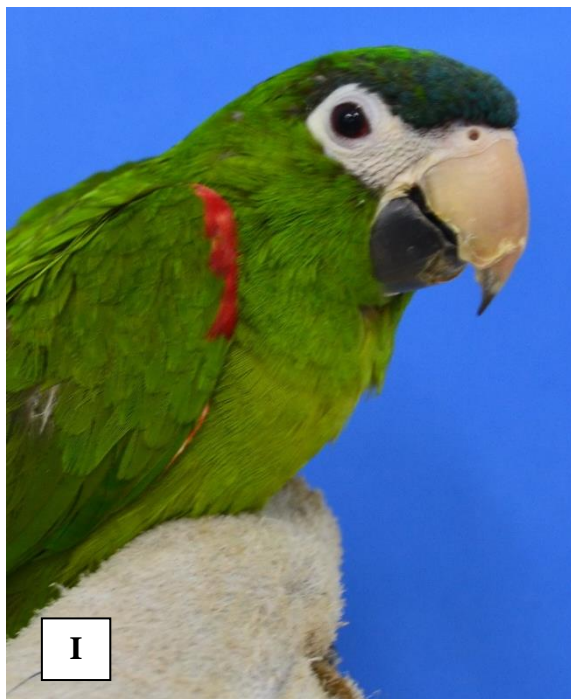
GUIA DE IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES



A: Arara Vermelha (*Ara chloropterus*); **B:** Arara Macao (*Ara macaw*); **C:** Arara Canidé (*Ara ararauna*); **D:** Papagaio Verdadeiro (*Amazona aestiva*).



E: Periquito Tuim (*Forpus xanthopterygiu*); **F:** Aratinga de Testa Azul (*Thectocercus acuticaudatus*);
G: Periquito Rei (*Eupsittula aurea*); **H:** Periquito da Caatinga (*Eupsittula cactorum*).



I: Maracanã Nobre (*Diopsittaca nobilis*); **J:** Papagaio do Mangue (*Amazona amazonica*); **K:** Papagaio da Várzea (*Amazona festiva*); **L:** Periquitão Maracanã (*Psittacara leucophthalmus*).

ANEXO III

FLUXOGRAMA METODOLÓGICO

